

UFRRJ

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**ADMINISTRAÇÃO DE ESTEROIDE ANABÓLICO DURANTE A
ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA
SUSCEPTIBILIDADE À INJÚRIA DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO
CARDÍACA EM RATOS *WISTAR* ADULTOS.**

FERNANDO DE AZEVEDO CRUZ SEARA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ADMINISTRAÇÃO DE ESTEROIDE ANABÓLICO DURANTE A
ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA
SUSCEPTIBILIDADE À INJÚRIA DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO
CARDÍACA EM RATOS *WISTAR* ADULTOS.

FERNANDO DE AZEVEDO CRUZ SEARA

Sob a Orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
Fisiológicas no Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas, área de concentração em
Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

FERNANDO DE AZEVEDO CRUZ SEARA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/07/2015



Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares. (Membro Interno - UFRRJ)
(Orientador)



Profa. Dra. Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno – UFRRJ)



Prof. Dra. Adriana Bastos de Carvalho (Membro Externo – UFRJ)

616.124

S439a

Seara, Fernando de Azevedo Cruz, 1989-

T

Administração de esteroide anabólico durante a adolescência: avaliação *ex vivo* da susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão cardíaca em ratos *wistar* adultos / Fernando de Azevedo Cruz Seara - 2015.

114 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 75-97.

1. Coração - Doenças - Teses. 2. Infarto do miocárdio - Teses. 3. Esteroides anabólicos - Administração - Teses. 4. Rato - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

“Acercando-me do fim de minha vida, não posso deixar de apelar para os novos acadêmicos, bem mais jovens do que eu, para que almejem tornar-se “linces”, como eram considerados os membros da primeira academia do mundo. Que enxerguem muito longe, abrangendo um ângulo acadêmico de saber muito amplo e passando essa atitude para seus alunos. Precisamos deixar de formar formiguinhas, treinadas para carregar pedacinhos de folhas de um lugar a outro quase que cegamente, e voltar a formar lincees”.

Prof. Dr. Cesar Timo-laria (1925 – 2005)

Carta para os novos membros da Academia Brasileira de Ciências

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às mentes brilhantes que fomentaram, e fomentam o arcabouço científico no qual estou me desenvolvendo.

Dedico esta dissertação às futuras mentes pensantes desta terra, especialmente àquelas semeadas em terras ruralinas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos **meus pais** por SEMPRE apostarem as fichas em mim e, além disso, por terem, muitas vezes, patrocinado meus devaneios científicos. Sem eles, nada disso seria possível. Também agradeço à minha sobrinha Rosa, pelo seu peculiar riso capaz de ativar, massivamente, o núcleo *Accumbens* de qualquer pessoa, e que foi, especialmente, importante nos meus momentos de repolarização.

Agradeço ao **professor e amigo Emerson Lopes Olivares**, por ter sido um grande mentor. Quem me conhece mais profundamente sabe que eu sempre procurei me espelhar no seu peculiar pensamento crítico (um dos mais afiados que já vi) e na sua capacidade ímpar de cativar as turmas de Farmacologia I e II. Portanto, tenho certeza que se evoluí, como cientista e professor, muito se deve à influência do mestre Emerson. Agradeço, também, por duas das referências que mais expandiram meus horizontes em relação à fisiofarmacologia cardiovascular (Livro do Opie e artigo do Francis et al. 2001). Fico honrado de estar na iminência de seguir os seus passos em terras “chagásicas”. Mestre, espero que esta parceria científica (etanólica e no rock’n roll) perdure por muitos anos!

Ao **professor e amigo José Hamilton Matheus Nascimento**, meus sinceros agradecimentos! Primeiro, devo agradecer por ter aberto as portas do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho a um forasteiro de terras (tão, tão) distantes e, não obstante, tê-lo feito com grande amizade e colaboração em tudo que precisei (e preciso!!!). Segundo, pela confiança que depositou em mim e no meu, suposto, potencial científico. Terceiro, pela enorme contribuição à minha formação científica e ética. Nunca vou esquecer-me das inspiradoras aulas de Biofísica de Membranas, fazendo-nos fosforilar no *Mempot* e no *Clampfit*! Muito obrigado mestre!

Seria um crime não agradecer à contribuição científica que o **professor (e estimado amigo) Luis Carlos Reis** fez à minha pessoa, desde os meus tempos de monitor. Espero que os alunos das novas gerações tenham noção do valor científico e acadêmico que o mestre Luis nos agrega, individualmente e ao DCF como um todo. O mestre Luis tem uma capacidade ímpar de agregar-nos conhecimento, em QUALQUER situação, seja num célere cafezinho nos corredores do DCF, seja nos fervorosos debates científicos, regados a muita tiramina, na sua casa!

Da mesma forma, não poderia deixar de agradecer ao **professor e grande amigo Wellington da Silva Côrtes**! Primeiramente, por ter aberto as portas do Departamento de Ciências Fisiológicas à minha pessoa, nos primeiros meses de 2010, quando então me tornei monitor de Farmacologia I e

II. Em segundo lugar, pelo banho de didática e conhecimento nas aulas de Farmacologia I, e também quando o ajudava na elaboração das aulas práticas de Farmacologia I, que me inspiraram quando comecei a lecionar. Se um dia eu alcançar 1/10 da sua didática, ficarei extremamente satisfeito! Não posso deixar de agradecê-lo pelo grande exemplo de orientação acadêmica que representou (e representa ainda), principalmente durante os meus primeiros projetos científicos, ainda como monitor (Nem Salomão, com sua indescritível serenidade, teria tanta paciência para aguentar os devaneios científicos, meus e do Robertinho).

Agradeço à **professora e amiga Norma Aparecida dos Santos Almeida**, pelo grande apoio ao longo do meu mestrado. Palavras certas na hora certa fazem toda diferença. Evidentemente, agradeço-a por ter aceitado compor a banca avaliadora do presente estudo e, já de antemão, pela contribuição científica ao mesmo! Obrigado professora!

Desde já, gostaria de agradecer à **professora Adriana Bastos Carvalho**, tanto por ter, prontamente, aceitado compor a banca avaliadora deste estudo, quanto pela contribuição científica nas aulas da disciplina de Fisiologia Cardiovascular no primeiro semestre de 2014 (nunca me esquecerei daquele exemplo do canudo do Ovomaltine, na aula de hemodinâmica!), pelo suporte experimental nas análises de biologia molecular e contribuição científica neste estudo.

Assim, também agradeço às **professoras Regina Goldenberg e Cristiane Del Corso** por terem lecionado, junto à professora Adriana, um das disciplinas mais interessantes que cursei ao longo da pós-graduação.

Agradeço, também, à **professora Andreia** pelo suporte científico que fomentou a este estudo, sempre com a maior boa vontade.

Ao amigo (praticamente irmão), **Roberto Laureano-Melo**, meus sinceros agradecimentos. Robertinho foi fundamental para a minha formação, pois, foi a pessoa que despertou em mim o “apetite”, quase insaciável, de ler artigos científicos, logo após ter sido selecionado para o curso de verão de fisiologia da USP. Roberto me ensinou a abusar da criatividade e imaginação na elaboração de hipóteses, assim como a utilizar meu senso crítico, portanto, grande parte da minha formação científica evoluiu por conta dele. Obrigado, amigo!

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho do DCF (**Claudinho, Rafael, Raoni, Phelipe Rodrigo, Raquel Nascimento, Anderson, Bruno, Iracema, George, Güínever, Fabrícia** etc...) por todos os momentos de diversão e pela contribuição que fizeram à minha formação científica ao longo dos 5 anos de DCF. Cada um de vocês foi essencial, com as suas respectivas contribuições.

De mais a mais, gostaria de agradecer a todos os **professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas**, de modo geral, o qual foi a minha segunda casa ao longo de muitos anos (muitas vezes a primeira casa, dado as madrugadas fazendo experimento com os demais alunos e às tarefas extracurriculares referentes à reestruturação do DCF). Todos, nas suas peculiaridades, me fizeram crescer como cidadão e cientista. Obrigado!

Aos meus amigos do **Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca** e do **Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular** (Putz, vamos lá: **Pedro, Paulo, Gustavo, Thaiz, Ainá, Dahienne, Mara, Manu, Natália (Ex-Ruralina!!!!), Raiana, Bruninha, Isa, Gabi Paulinha, Bernardo, Leo, Henry e todos os demais...**), agradeço pelos momentos de descontração, *brainstormings* e, é claro, por terem, prontamente, me abraçado quando, no momento, eu era um recém chegado no LEFC, em março de 2013. Faço um agradecimento especial, mais do que merecido, à **Day, Ainá, Tatá, Nati e Rai**, pelo **INENARRÁVEL** apoio neste estudo. A Nati que, sol e chuva, estava lá comigo, tratando os animais! A Dahienne, Tatá e Ainá, eu agradeço por não terem me matado depois da (intensamente cansativa) semana fazendo experimento ao meu lado! Enfim, agradeço a Rai, por ter me iniciado na vida da biologia molecular e ter contribuído, enormemente, neste estudo e na minha formação como fisiologista.

Não poderia deixar de me lembrar dos meus amigos (*daydream generation*) que **SEMPRE** estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada científica, **Rafael, Zé, Gabriel, Alan, Lucas, Miguel e Victor**. Todos foram fundamentais ao me darem suporte emocional, principalmente perante os problemas pessoais que enfrentei no final do mestrado. "*Aqueles que desobedecem as regras são tratados como lixo, mas, aqueles que abandonam seus companheiros, são piores que lixo.*" Amigos, muito obrigado!

Aos amigos que fiz ao longo do curso de Medicina Veterinária, **Ivaí, Makita, Paulo, Lucas, Gabi Cid, Gabi Mastrangelo, Aninha, Ju e Ilê**, agradeço pelos imensuráveis momentos de diversão que vocês me proporcionaram e por todo apoio!! Os caminhos divergentes nos separaram um pouco, porém, fica aqui documentada toda a minha gratidão! Obrigado gente! **UMA VEZ VETERINÁRIA, VETERINÁRIA É NA RURAL!!!**

Agradeço do fundo do meu ventrículo esquerdo à **Carol, Tainá e André**, grandes companheiros e amigos que fiz no pré-vestibular e que, até hoje, me proporcionam momentos de diversão, café e bobagens, tão importantes para as minhas repolarizações em meio à tensão do mestrado. Valeu galera!

A **Francisco e Regina Ribeiro Novais de Carvalho**, deixo meus sinceros agradecimentos por terem sido a minha segunda família ao longo de 2 anos e meio, e por todo tipo de apoio que me deram durante mais da metade do meu mestrado! Foram momentos divertidíssimos! Muito obrigado por tudo!!!!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, nas suas respectivas formas e escalas, ajudaram-me nessa auspiciosa jornada pela ciência. Apesar dos agradecimentos supracitados, não há, de fato, palavras suficientes, em quantidade e qualidade, para definir a felicidade que tenho em completar, ainda que não da forma como tencionei, esta etapa da minha vida. Obrigado!

RESUMO

De acordo com a OMS, as doenças isquêmicas do coração consistem na maior *causa mortis* global. Dentre as abordagens terapêuticas, a mais eficaz é a reperfusão. Apesar da melhora no prognóstico pós-infarto, a recuperação plena da função cardíaca dificilmente é alcançada, devido a injúria de isquemia/reperfusão (IIR). Neste contexto, a administração de EA em ratos *Wistar* adultos enaltece a susceptibilidade à IIR. Ademais, a administração de EA em ratos *Wistar*, ao longo da adolescência, favorece o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares persistentes durante a fase adulta. Desta forma, objetivou-se, com o presente estudo, analisar os efeitos da sobrecarga crônica de propionato de testosterona, ao longo da fase adolescente, na susceptibilidade à IIR, em ratos *Wistar* adultos. Para tanto, foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos, divididos em dois grupos: EA (Propionato de testosterona 5 mg kg⁻¹, a partir do 26º dia pós-natal, 5 vezes por semana/ 5 semanas) e CTL (veículo). No 82º dia pós-natal, os ratos foram submetidos à eutanásia para a coleta de órgãos. Os corações isolados foram submetidos à perfusão artificial em aparato de *Langendorff*, e, assim, ao protocolo de isquemia/reperfusão. As pressões diastólica final (PDF), sistólica (PS) e desenvolvida (PD), do ventrículo esquerdo (VE), e as primeiras derivadas de pressão do VE, máxima e mínima (dP/dt máxima e mínima, respectivamente), foram mensuradas através de um balão de látex intraventricular, conectado a um transdutor de pressão. Através do eletrocardiograma, foi analisada a susceptibilidade aos episódios arrítmicos. Ao final do protocolo, as áreas de infarto foram demarcadas e a expressão gênica das cadeias pesadas de miosina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, assim como a atividade das enzimas da família de niconinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (Nox), no ventrículo esquerdo, foram avaliadas. Em relação ao grupo Controle, os corações dos animais tratados com EA apresentaram: Hipertrofia, através do aumento na massa (aumento de 33%, P<0,001) e do índice cardíaco (aumento de 37%, P<0,001); aumento significativo da área de infarto (aumento de 54,76%, P<0,05); Tênuo recuperação da PDFVE, assim como da PDVE, durante a reperfusão; Inferior recuperação da dP/dt máxima, ao longo da reperfusão, apesar da equivalente recuperação na PSVE; Reduzida dP/dt mínima basal e, subsequentemente, redução na recuperação deste parâmetro, ao longo da reperfusão; Aumento significativo da expressão gênica da MHCβ (P<0,01), condizente com o prejuízo no desempenho mecânico; Maior incidência de episódios arrítmicos, ao longo da reperfusão (aumento de 100%, P<0,01). Não houve diferença em relação às atividades das Nox. Pela primeira vez, foi demonstrado que a administração de EA, ao longo da adolescência, provoca hipertrofia e reprogramação gênica cardíaca, persistente durante a fase adulta, além de aumentar, significativamente, a susceptibilidade à IIR, por meio do aumento na área de infarto e piora na recuperação das propriedades mecânicas e elétricas cardíacas, em corações isolados de ratos *Wistar* adultos.

ABSTRACT

According to World Health Organization, ischemia heart diseases are the leading cause of death worldwide. Among therapeutic approaches, reperfusion is the most effective and indicated is reperfusion. Despite the better post-infarction prognostic, absolute improvement on cardiac function is hardly achieved due to ischemia/reperfusion injury (IRI). Within this context, anabolic steroids (AS) administration, in adult *Wistar* rats, significantly increase IRI susceptibility. Moreover, chronic administration of AS, during adolescent phase, induces persistent cardiovascular dysfunctions along adulthood. Therefore, the aim of the present study was to analyze the effects of chronic administration of supraphysiologic doses of testosterone propionate, during adolescent phase, in the susceptibility to ischemia/reperfusion injury, in adult *Wistar* rats. To perform it, 24 *Wistar* rats were allocated into two groups, AS (Testosterone propionate 5 mg kg⁻¹, since 26^o day postnatal, 5 days per week, during 5 weeks) and Control (Vehicle). In the 82^o postnatal, rats were euthanized and hearts, livers, lungs, kidneys and testicles were collected. Isolated hearts were artificially perfused with modified *Krebs-Henseleit* solution, through *Langendorff* apparatus, and, then, submitted to *ex vivo* ischemia – reperfusion protocol (20 minutes of stabilization, 30 minutes of global ischemia and 60 minutes of reperfusion). The left ventricle (LV) end diastolic- LVEDP), systolic- (LVSP) and developed pressures (LVDP), as well as first derivatives of pressure, maximum and minimum (dP/dt, maximum and minimum, respectively) were measured through an intraventricular latex balloon, connected to a pressure transducer. Through the electrocardiogram, susceptibility to arrhythmic episodes was analyzed. At the end of the protocol, area of infarct was delimited and gene expression of α and β myosin heavy chains and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, as well as the activity of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (Nox) enzymes, were calculated. In comparison to Control group, hearts from AS group presented: Hypertrophy, due to an increase in cardiac mass (33%, P<0,001) and index (37%, P<0,001); Significantly increase in the area of infarct (54,76%, P<0,05); Worst recovery of both LVEDP and LVDP, along reperfusion; Less recovery of maximum dP/dt, during reperfusion, despite the equivalent LVSP; Reduced basal minimum dP/dt and, subsequently, reduction in the recovery of the aforementioned parameter, regarding reperfusion period; Enhanced gene expression of MHC β (%), consistent with the loss of mechanical performance; Increased incidence of arrhythmic episodes in the reperfusion period (100%, P<0,01). No statistical difference could be seen in regard to the Nox activity. For the first time, we demonstrated that AS treatment during adolescent phase promotes cardiac hypertrophy and gene reprogramming, both persistent during adulthood, besides an increase susceptibility to IRI, through in the larger area of infarct and poor recovery of cardiac electrical and mechanical proprieties, in isolated hearts of adult *Wistar* rats.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Mortalidade associadas às doenças comunicáveis.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2 Ruptura da capa fibrosa inerente à placa aterosclerótica.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3 Trocas iônicas durante a isquemia, em cardiomiócitos.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 4 Contribuição da injúria de reperfusão na área de infarto final.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5 Trocas iônicas durante a reperfusão cardíaca, em cardiomiócitos. ...</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6 Ação das enzimas antioxidantes.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 7 Mecanismos de morte celular atrelados à injúria de isquemia/reperfusão.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 8 Dimorfismo sexual atrelado à mortalidade atrelada às doenças cardiovasculares.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9 Protocolo experimental.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 10 Aparato de Langendorff.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 11 Área de infarto em relação à área total¹⁰.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 14 Susceptibilidade à ocorrência de episódios arrítmicos.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15 Reatividade aórtica.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 16 Reativação da programação gênica fetal.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17 Expressão gênica de SERCA2a e RyR.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 18 Atividade das enzimas DUOX e NOX.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 19 Expressão de mRNA das enzimas antioxidantes.....</i>	<i>47</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos primers utilizados	35
Tabela 2 Dados morfométricos.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Bifosfato de adenosina, do inglês, *Adenosine diphosphate*

AT1 – Receptor de angiotensina II tipo 1

ANGII – Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

ATP – Trisifosfato de adenosina, do inglês, *Adenosine triphosphate*

Bcl-2 – Linfoma de célula B 2, do inglês, *B-cell lymphoma 2*

Bax – Proteína X associada ao Bcl-2, do inglês, *Bcl-2 associated X*

BVP – Batimento ventricular prematuro

CD95L – Grupamento de diferenciação 95, do inglês, *Cluster differentiation 95 (Fas/APO)-ligand*

dP/dt – Primeira derivada de pressão

Duox –Dual oxidase

DCV – Doenças Cardiovasculares

DHT – Dihidrotestosterona

DLL – domínio de ligação ao ligante

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês, *desoxiribonucleic acid*

DTT – ditioneitol

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EGTA – Ácido tetracético etileno glicol, do inglês, *ethylene glycol tetraacetic acid*

ECG – Eletrocardiograma

ERO – Espécies reativas de oxigênio

EA – Esteroides anabólicos

FOXO3 – Do inglês, *Forkhead Box O₃*

FasL – Do inglês, *Fas ligand*

GLUT – Transportador de glicose, do inglês, *glucose transporter*

GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IL – Interleucina

Katp – Canal para potássio sensível ao ATP

KHB – Tampão Krebs-Henseleit, do inglês, *Krebs-Henseleit buffer*

LTCC – Canal para cálcio tipo L, do inglês, *L-type calcium channel*

MHC – Cadeia pesada de miosina, do inglês, *Myosin Heavy Chain*

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Nox - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NCX – Trocador de Na⁺ / Ca²⁺ , do inglês, Na⁺ / Ca²⁺ *Exchanger*

PKB – Proteína cinase B, do inglês, *Protein Kinase B*

P38MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno p38, do inglês, *p38 Mitogen activated protein kinase*

PMSF – Fluoreto fenil metano sulfonil, do inglês, *phenylmethanesulfonylfluoride*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase chain reaction*

P26 – 26º dia pós-natal

P60 – 60º dia pós-natal

P82 – 82º dia pós-natal

PTM – Poro de transição mitocondrial

pH – Potencial hidrogeniônico

PDVE – Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

PDFVE – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

QTd – dispersão no intervalo QT

RT – Transcrição reversa, do inglês, *Reverse transcription*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês, *Ribonucleic acid*

STAT – Sinal de tradução e ativação de transcrição, do inglês, *Signal transducer and activator of transcription*

SOCS3 – Supressor de sinalização de citocinas, do inglês, *Suppressor of cytokine signaling*

SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona

SOD – Superóxido dismutase

Smac – Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria, do inglês, *Second mitochondria-derived activator of caspases*

SERCA2A – ATPase de cálcio sarco(endo)plasmática, do inglês, *Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase*

SUS – Sistema Único de Saúde

TTC – Cloreto trifenil tetrazólio, do inglês, *Trifenil tetrazolium chloride*

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	1
1.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO: DA ISQUEMIA À REPERFUSÃO.....	3
1.2.1 ATEROSCLEROSE E ISQUEMIA CARDÍACA	3
1.2.2 INJÚRIA DE ISQUEMIA	5
1.2.2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO: INABILIDADE EM GERAR E USAR ENERGIA	5
1.2.2.2 ACIDIFICAÇÃO DO pH INTRACELULAR, DISTÚRBIOS NA CINÉTICA DO CÁLCIO E MORTE CELULAR	7
1.2.3 INJÚRIA DE REPERFUSÃO	10
1.2.4 ESTRESSE OXIDATIVO: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS	13
1.3 FATORES DE RISCO	17
1.3.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS.....	17
1.3.2 CONSUMO ILÍCITO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS	19
1.3.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DOS EA SOBRE AS DCV	21
2 OBJETIVO GERAL	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 JUSTIFICATIVA.....	26

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 ANIMAIS.....	28
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	28
4.3 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	29
4.4 PREPARAÇÃO DOS CORAÇÕES ISOLADOS	29
4.5 PROTOCOLO DE ISQUEMIA / REPERFUSÃO.....	31
4.6 ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIAS.....	31
4.7 REATIVIDADE DA AORTA	32
4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	32
4.8.1 EXTRAÇÃO DO RNA	32
4.8.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO RNA.....	33
4.8.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....	34
4.8.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR).....	35
4.9 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
4.9.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE VE	36
4.9.2 ATIVIDADE DE DUOX E NOX	36
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS	39
5.2 ÁREA DE INFARTO	39
5.3 FUNÇÃO VENTRICULAR	40

5.4 ARRITMIAS CARDÍACAS	42
5.5 REATIVIDADE AÓRTICA.....	43
5.6 REXPRESSÃO DO PROGRAMA GENÉTICO FETAL.....	44
6 DISCUSSÃO	48
6.1 REMODELAMENTO CARDÍACO	49
6.2 REATIVIDADE DA AORTA	52
6.3 AUMENTO NA ÁREA DE INFARTO	55
6.4. COMPROMETIMENTO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS CARDÍACAS	59
6.5 REPROGRAMAÇÃO GÊNICA FETAL.....	62
6.6 COMPROMETIMENTO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS CARDÍACAS	65
6.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CÁLCIO	66
6.8 ESTRESSE OXIDATIVO: POSSÍVEL EPICÊNTRRO.....	68
7 CONCLUSÃO	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente metade dos óbitos não comunicáveis, anualmente, se devem às doenças cardiovasculares (DCV) (Mackay *et al.* 2004; Mendis *et al.* 2011). Dentro deste contexto, a hipertrofia ventricular constitui um indicador de grande relevância no risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. Segundo *Framingham Heart Study*, os indivíduos que apresentam hipertrofia ventricular, diagnosticada por alterações eletrocardiográficas, apresentam risco de morte cerca de seis vezes maior que a população em geral (Kannel *et al.* 1983).

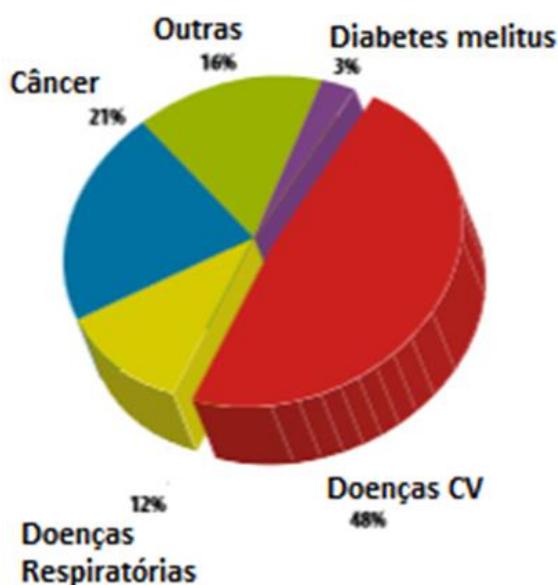


Figura 1. Mortalidade associadas às doenças não comunicáveis.¹

¹ As doenças cardiovasculares matam, aproximadamente, 17 milhões de pessoas anualmente, superando todos os tipos de câncer. Cerca de 80% destes óbitos foram relatados em países subdesenvolvidos. Adaptado de (Mendis *et al.* 2011)

No Brasil, de acordo com dados fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a mortalidade associada às DCV sofreu uma redução de 4,02% ao longo dos últimos 20 anos (Sim 2011). No entanto, apesar deste referido dado representar um considerável progresso no aspecto da saúde pública, as DCV permanecem como a maior *causa mortis* e a terceira maior causa de internações pelo SUS (Sim 2011).

Dentre as DCV, o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular cerebral e a doença vascular periférica apresentam as maiores letalidades, sendo responsáveis por uma em cada três mortes no mundo. Apesar da redução na mortalidade atrelada ao IAM, observada na última década, aproximadamente 7,3 milhões de pessoas morrem, anualmente, devido a episódios de infarto do miocárdio, consolidando-o, globalmente, como a maior *causa mortis* dentre as doenças comunicáveis (Yeh *et al.* 2010).

Consonante com o padrão global, as taxas de mortalidade concernentes ao IAM em diversas nações desenvolvidas também estão decrescendo desde a década de 60, destacando-se os Estados Unidos, Dinamarca, Bélgica e Japão (McGovern *et al.* 1996; Kirchhoff *et al.* 1999; Cooper *et al.* 2000; Unal *et al.* 2004; Velagaleti *et al.* 2008; Tu *et al.* 2009; Takii *et al.* 2010). Todavia, a magnitude tangente ao IAM ainda é preocupante nestas nações. Estima-se que as doenças coronarianas sejam responsáveis por uma a cada seis mortes nos Estados Unidos, sendo que a cada 44 segundos um cidadão norte americano apresentará um episódio de infarto do miocárdio (Go *et al.* 2014). Além disso, projeções computacionais fomentadas pela *American Heart Association* estipulam um aumento de, aproximadamente, 18% na prevalência da doença coronariana até 2030, nos Estados Unidos (Go *et al.* 2014).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 66 mil vítimas de IAM morrem, anualmente, de acordo com a última avaliação ((Sih/Sus) 2014). Diante da incidência de, aproximadamente, 400 mil casos anuais, portanto, observa-se uma elevada taxa de mortalidade, sendo esta a principal causa isolada de mortalidade no país ((Sih/Sus) 2014). Além disso, segundo dados do DATASUS, houve um aumento de 45,7% no número de internações por IAM, no Brasil, durante o período de 1995 a 2003 ((Sih/Sus) 2014). Neste contexto,

estima-se que as doenças isquêmicas do coração conferem ao SUS um gasto em torno de R\$ 522.286.726 (Teich e Araujo 2011). Porém, levando-se em conta os custos para o Sistema Suplementar de Saúde, o custo total destinado às doenças coronarianas contabiliza-se em cerca de R\$ 3,8 bilhões, no mesmo ano (Teich e Araujo 2011).

1.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO: DA ISQUEMIA À REPERFUSÃO

1.2.1 ATEROSCLEROSE E ISQUEMIA CARDÍACA

Ab origine, o infarto, em qualquer tecido, é, basicamente, a morte celular decorrente da redução no suporte de substratos energéticos e oxigênio ao órgão, ou parte dele. Frequentemente, o princípio do IAM consiste no bloqueio da circulação coronariana, da ruptura da placa aterosclerótica, com formação de trombo (Thygesen *et al.* 2012). Especificamente, mediante a presença de fatores de risco, como dislipidemia, alta concentração de moléculas vasoconstritoras, ou citocinas pró-inflamatória, é possível observar aumento na expressão de moléculas de adesão na parede luminal de alguns vasos sanguíneos, como as artérias coronárias (Cybulsky e Gimbrone 1991; Demyanets *et al.* 2011; Schmitt *et al.* 2014). Deste modo, estas moléculas facilitam a adesão de leucócitos derivados da circulação sanguínea, geralmente atraídos por fatores quimiotáticos atrelados aos processos iniciais da formação da placa aterosclerótica (Park *et al.* 2013). Após migrarem para a íntima dos vasos, os leucócitos secretam moléculas pró-inflamatórias e vasoativas no microambiente vascular, como prostanoídes e leucotrienos (Spanbroek *et al.* 2003; Wang *et al.* 2011; Lundberg *et al.* 2013).

Como consequência da carga inflamatória provenientes dos leucócitos, as células musculares lisas migram da túnica média para a íntima e, não obstante, passam pelos processos de hipertrofia e hiperplasia (Wang *et al.* 2011; Pi *et al.* 2013). Subsequentemente, após migrarem, as células musculares lisas, juntamente com as células endoteliais e leucócitos, promovem a secreção de metaloproteases (Wågsäter *et al.* 2011; Huang *et al.*

2012; Jiang *et al.* 2012). Assim sendo, as metaloproteases iniciam uma série de alterações no microambiente vascular e cardíaco, como indução de apoptose, hipertrofia, hiperplasia e migração celular, remodelamento da matriz extracelular vascular e miocárdica (Johnson *et al.* 2011; Casagrande *et al.* 2012).

Concomitantemente, alguns componentes da matriz extracelular favorecem a adesão de lipoproteínas de baixa densidade, que, por sua vez, são oxidadas e glicosiladas (Mangat *et al.* 2012). Assim, as lipoproteínas oxidadas prolongam a resposta inflamatória e, não obstante, induzem o processo de diferenciação dos macrófagos em células espumosas, através da ativação do receptor Toll tipo 4 (Bekkering *et al.* 2014; Schmitt *et al.* 2014). Por conseguinte, as células espumosas se acumulam na íntima do vaso e, desta forma, contribuem para o crescimento da placa aterosclerótica (Zhao *et al.* 2012). Uma vez formada, a placa aterosclerótica sofre intenso atrito do fluxo sanguíneo e, portanto, fica passível de se romper (Fig.2).

Após o rompimento da capa fibrosa, inicia-se um processo trombogênico através de, principalmente, duas vias. Inicialmente, o contato das plaquetas com o colágeno, presente na placa aterosclerótica, é capaz de provocar ativação plaquetária (Ungerer *et al.* 2011). Além disso, o fator tecidual secretado por leucócitos contribui para o preâmbulo do processo de coagulação sanguínea (Toschi *et al.* 1997). Em face destes eventos, as plaquetas, portanto, convertem o fibrinogênio em fibrina, além de secretarem o fator *von Willeebrand*, favorecendo a agregação plaquetária na rede de fibrina (Cosemans *et al.* 2011; Kuijpers *et al.* 2014). Adicionalmente às etapas anteriores, a secreção do inibidor do ativador de plasminogênio no microambiente arteriosclerótico anula o desdobramento da resposta fibrinolítica (Eitzman *et al.* 2000).

Isto posto, em face dos eventos supracitados, o referido trombo sofre o processo de fragmentação e, posteriormente, embolização e, assim, bloqueia a microcirculação coronariana. Em decorrência do bloqueio no fluxo sanguíneo, o suporte de oxigênio, assim como de combustíveis metabólicos é intensamente atenuado no miocárdio consecutivo à trombose, configurando o quadro de

isquemia miocárdica. Com o passar do tempo, a falta de nutrientes e oxigênio, assim como a redução na depuração de produtos derivados do metabolismo celular, conduz, através da injúria de isquemia, à morte de cardiomiócitos e, portanto, ao infarto do miocárdio (Thygesen *et al.* 2012).

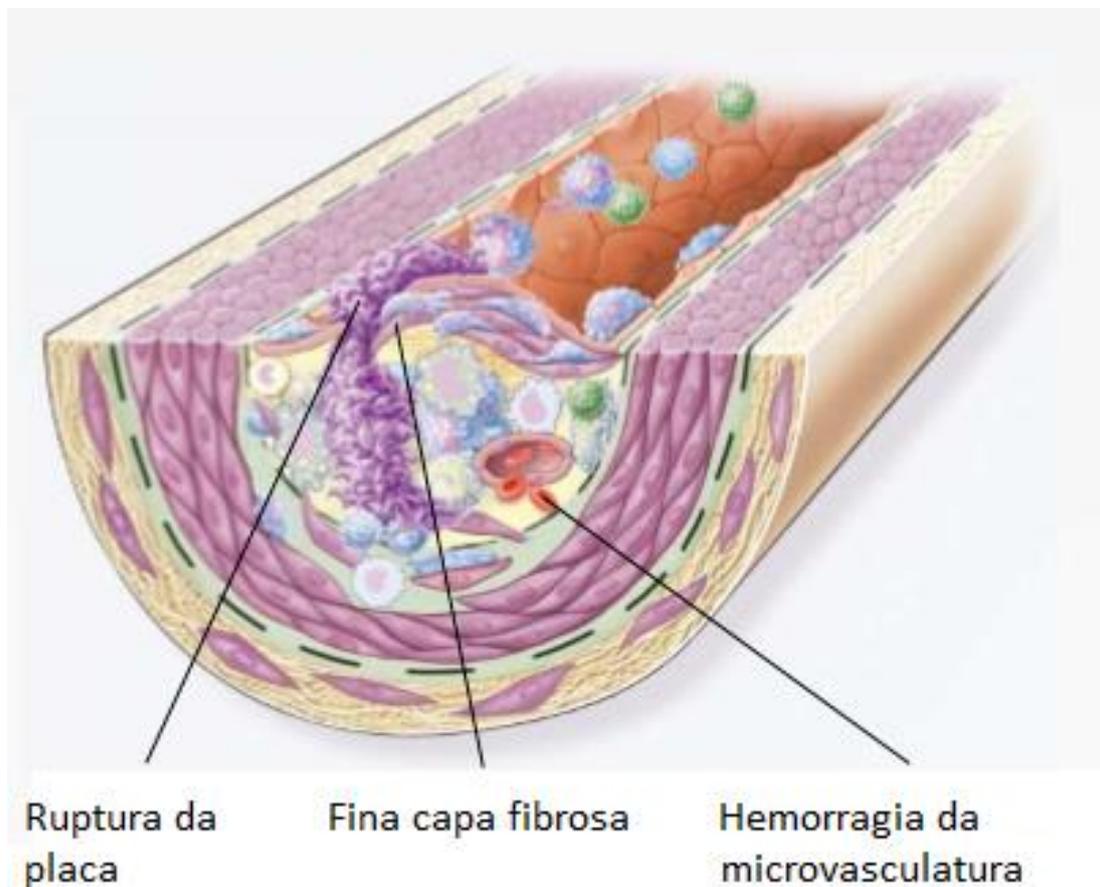


Figura 2 Ruptura da capa fibrosa inerente à placa aterosclerótica.²

1.2.2 INJÚRIA DE ISQUEMIA

1.2.2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO: INABILIDADE EM GERAR E USAR ENERGIA

O coração de mamíferos é um órgão que desempenha, principalmente, metabolismo aeróbio para suprir a síntese de fosfatos de alta energia, como o

² É possível observar a formação de um “inflamassoma”, rico em lipídeos, envolto por uma fina capa fibrosa e que, mediante a pressão exercida pela corrente sanguínea, pode romper a qualquer momento. Adaptado de (Ross 1999).

trifosfato de adenosina (ATP). Em sua essência, a síntese de ATP, em cardiomiócitos, depende, primordialmente, da concentração intracelular de acetil-coenzima A, oriunda, sobretudo, da β -oxidação de ácidos graxos e, em segundo plano, da glicólise, sendo a acetil-coenzima A metabolizada através do ciclo de Krebs. Portanto, é correto constatar que geração de energia no cardiomiócito se sujeita, basicamente, a oferta de ácidos graxos, glicose e oxigênio, para a manutenção do metabolismo aeróbio {Bishop, 2014 #304}.

Sob este aspecto, o coração é um órgão de alta exigência metabólica, o que é ilustrado pela elevada extração de oxigênio do sangue, durante o repouso. Assim, tanto o fluxo sanguíneo coronariano, quanto a pressão parcial deste gás na circulação coronariana deve ser proporcional à demanda energética dos cardiomiócitos, de modo que a oferta seja suficiente para suprir a demanda metabólica. Precisamente, presume-se que o fluxo sanguíneo coronariano, no adulto saudável é, aproximadamente, $0,61 - 0,75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ {Fujiwara, 2001 #305}. Nesta condição, estima-se que o consumo basal de oxigênio varia em torno de $88 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, o que representa cerca de 75% do contingente de oxigênio que atinge o órgão (Walsh *et al.* 1989; Porenta *et al.* 1999).

Em contraste, a oclusão da artéria coronária descendente esquerda provoca redução de 71 – 81% do fluxo sanguíneo, em modelos experimentais com cães (Bishop *et al.* 1976; Heyndrickx *et al.* 1978; Khuri *et al.* 1985; Porenta *et al.* 1999; Cave *et al.* 2000). Além disso, durante o período de isquemia global em modelo de coração isolado em aparato de *Langendorff*, o nível tecidual de oxigênio é reduzido à cerca de 5,8 % do valor pré-isquemia, em camundongos adultos (Xu *et al.* 2008).

Inevitavelmente, a redução do nível tecidual de oxigênio, assim como a própria falta de combustíveis metabólicos provoca um desequilíbrio metabólico nos cardiomiócitos. Este desequilíbrio se caracteriza pela redução na biossíntese de fosfatos de alta energia e inabilidade na sua utilização. Dentre estas moléculas destaca-se o ATP, cuja síntese, *in vivo*, pode decair para, aproximadamente, 9% do nível basal, em modelos experimentais de infarto do miocárdio *in vivo*, mediante ligadura da artéria circunflexa (Opie *et al.* 1975;

Reimer *et al.* 1981; Prabhakar *et al.* 2003; Moens *et al.* 2008). De maneira similar, em modelos *ex vivo* no aparato de *Langendorff*, a biossíntese de ATP se reduz a valores na faixa de 20 – 51% do valor pré-isquêmico, em ratos *Wistar*, dependendo do tempo de isquemia (Cave *et al.* 2000; Imahashi *et al.* 2004).

Além da inabilidade em sintetizar ATP, decorrente da desaceleração no metabolismo aeróbio, a biodisponibilidade de fosfocreatina também é reduzida. Dados observados em modelos experimentais de infarto do miocárdio, *in vivo*, sugerem que a biodisponibilidade de fosfocreatina pode decrescer, aproximadamente, 80-50% mediante oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, em primatas, cães e ratos *Wistar* (Opie *et al.* 1975);(Guth *et al.* 1987; Prabhakar *et al.* 2003). À vista disso, o fornecimento de energia para estruturas intracelulares, principalmente às proteínas sarcoméricas e sarcolemas, é comprometido. Como corolário natural deste processo, as propriedades mecânicas e eletrofisiológicas dos cardiomiócitos são, amplamente, prejudicadas.

1.2.2.2 ACIDIFICAÇÃO DO pH INTRACELULAR, DISTÚRBIOS NA CINÉTICA DO CÁLCIO E MORTE CELULAR

Com a premissa de manter os níveis de ATP e fosfocreatina dentro da faixa fisiologicamente aceitável, o metabolismo cardiomiocitário desvia-se, quase exclusivamente, para a glicólise. Em face dos níveis módicos de oxigênio, a inabilidade da cadeia de fosforilação oxidativa em utilizar NADH, decorrente da redução dos complexos citocromáticos, provoca o acúmulo desta molécula no sarcoplasma, o que favorece a redução do piruvato em ácido láctico (Opie *et al.* 1975). Conseqüentemente, a elevação do nível intracelular de lactato reduz, sobremodo, o pH no meio intracelular (Imahashi *et al.* 2004). Por sua vez, a acidificação do meio intracelular promove efeito inibitório sobre a própria glicólise e, assim, contribui para a redução da síntese de fosfatos de alta energia (Imahashi *et al.* 2007) Além disso, o pH ácido também favorece a

dessensibilização da troponina C ao cálcio, o que reduz a reserva inotrópica e, assim, favorece a ocorrência de assitolia (Parsons *et al.* 1997).

Em virtude da acidificação do meio intracelular, a extrusão de prótons para o meio extracelular, promovida pelo trocador Na^+/H^+ (NHE), é, significativamente, estimulada (Klein *et al.* 2000; Yoshida e Karmazyn 2000; Kusumoto *et al.* 2001). Conseqüentemente, o influxo de sódio, por esta mesma via, também é elevado de forma relevante. Diante destas alterações eletroquímicas, a enzima Na^+/K^+ ATPase desempenha um papel chave no reestabelecimento do gradiente iônico, ao transportar 3 íons sódio para o meio extracelular e 2 íons potássio para o meio intracelular, mediante o gasto de ATP. Todavia, a redução do nível intracelular de ATP impede o funcionamento adequado desta enzima (Fuller *et al.* 2003). Deste modo, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) assume o papel de principal transportador de sódio para o meio extracelular, em troca da intrusão de íons cálcio. Em decorrência dos eventos supracitados, a concentração intracelular de cálcio eleva-se suntuosamente (Wei *et al.* 2007).

Não obstante, o referido aumento prévio na concentração sarcoplasmática de sódio, pelo NHE, favorece a passagem deste íon para cardiomiócitos circunvizinhos, através das junções *gap* e, assim, propaga a elevação na concentração de cálcio, promovida pelo NCX (Ruiz-Meana *et al.* 1999). Ademais, a redução da atividade desempenhada pela ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), devido ao déficit de ATP, também contribui para a sobrecarga sarcoplásmica de cálcio, presente na isquemia cardíaca (Krause e Hess 1984; French *et al.* 2006; Xin *et al.* 2011). Por conseguinte, o miocárdio é conduzido ao estado de contratura isquêmica.

Somado à sobrecarga de cálcio, as pontes cruzadas acto-miosínicas não se desfazem, em face da depleção de ATP, o que, por sua vez, corrobora a indução da contratura miocárdica e ruptura das fibras musculares (Lowe *et al.* 1979; Swartz *et al.* 1999; Dudnakova *et al.* 2003). A contratura miocárdica, *per se*, reduz a complacência ventricular, ao passo que a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo eleva-se significativamente. Conseqüentemente, o enchimento ventricular é diretamente prejudicado e, assim, o débito sistólico e

o débito cardíaco são dramaticamente reduzidos, elevando o risco de choque cardiogênico.

Além disso, a ativação de proteases dependentes do cálcio, como a calpaína, fragiliza a estrutura celular, através da degradação de proteínas intracelulares, especialmente as proteínas do citoesqueleto (Khalil *et al.* 2005). Simultaneamente, o cálcio também ativa cascatas de sinalização pró-apoptóticas (Chen *et al.* 2005). Todavia, todos os eventos supracitados, dependentes da sobrecarga de cálcio, procedem lentamente, uma vez que o pH ácido os retarda, e até mesmo os inibe (Cohen *et al.* 2007).

Não obstante em provocar a contratatura miocárdica, o desequilíbrio iônico também desestabiliza o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular. Desta maneira, o volume celular eleva-se, significativamente, e, junto à fragilização do citoesqueleto promovida pela hiperativação da calpaína e pela contratatura, favorece a ruptura do sarcolema e morte celular. A ruptura sarcolema promove a liberação de diversas substâncias pró-inflamatórias, proteolíticas e quimiotáticas na matriz extracelular (Deten *et al.* 2002; Hayashidani *et al.* 2003; Tao *et al.* 2004). Subsequentemente, sucede-se a resposta inflamatória através da infiltração de neutrófilos e macrófagos, além da degradação proteolítica do meio intersticial, configurando o processo de necrose de coagulação (Tao *et al.* 2004; Sosnovik *et al.* 2007).

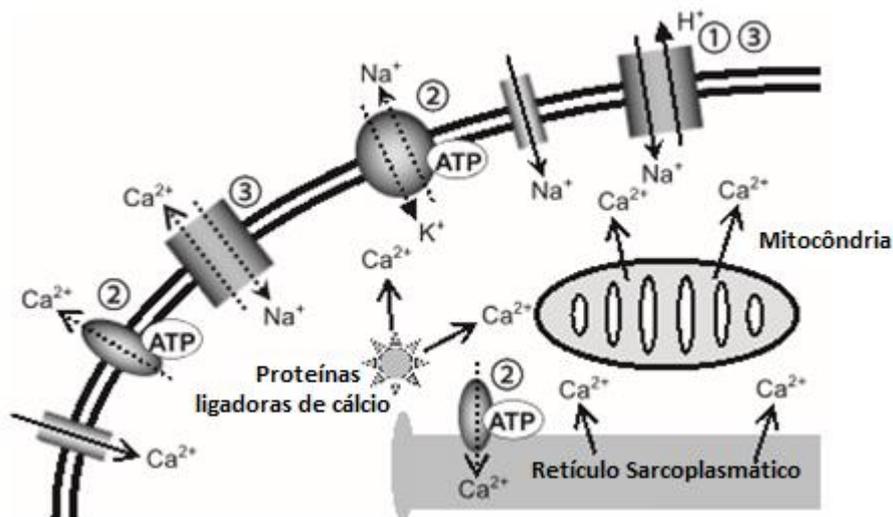


Figura 3. Trocas iônicas durante a isquemia em cardiomiócitos.³

1.2.3 INJÚRIA DE REPERFUSÃO

Com base nos eventos descritos anteriormente, é natural enaltecer a conjectura de que o reestabelecimento do fluxo sanguíneo seja benéfico à higidez do paciente. De fato, a reperfusão consiste na abordagem terapêutica mais eficaz quando há viabilidade miocárdica. Assim sendo, métodos de reperfusão vêm sendo amplamente recomendados pelas diretrizes da *American Heart Association*, *European Society of Cardiology* e Sociedade Brasileira de Cardiologia, através da intervenção coronariana percutânea, anticoagulantes e/ou fibrinolíticos (Barron *et al.* 1998; Steg *et al.* 2012; O'gara *et al.* 2013). Tanto em nível clínico quanto experimental, a reperfusão é capaz de reduzir a área de infarto em até 40%, além de melhorar o desempenho ventricular, em relação às propriedades elétricas e mecânicas, e reduzir a mortalidade pós-infarto (Fig.4) (Ginks *et al.* 1972; Chan *et al.* 2009). No entanto, quanto mais tardia for a intervenção hospitalar, menor é a eficácia da reperfusão (Reimer *et al.* 1981; O'gara *et al.* 2013).

³ 1) Extrusão de H⁺ devido à redução do pH; 2) Desativação da bomba de sódio / potássio e das bombas de cálcio devido à perda de ATP; 3) Redução da extrusão de cálcio por conta do acúmulo de sódio no meio intracelular. Adaptado de Sanada 2011.

A despeito dos seus benefícios, a reperfusão, *per se*, é capaz de provocar alterações adversas ao microambiente cardíaco e, portanto, como fora referido por Braunwald & Kloner, é uma espada de dois gumes (Braunwald e Kloner 1982). A primeira ideia a respeito do contraponto negativo da reperfusão miocárdica remonta à década de 70, com Jennings e colaboradores (Reimer *et al.* 1977). Foi observado que, mediante a reperfusão, os cardiomiócitos assumem um aspecto túrgido, ilustrado pela ruptura do arcabouço celular, contração das bandas sarcoméricas e grânulos intramitocondriais de fosfato de cálcio (Reimer *et al.* 1977). Assim, sugere-se que a reperfusão acelera o desenvolvimento de necrose em cardiomiócitos. Consonante com este aspecto, cerca de 10% dos indivíduos que sofrem de IAM morrem durante os procedimentos de hospitalização e 25% desenvolvem insuficiência cardíaca, apesar dos procedimentos de reperfusão (Rezkalla *et al.* 2010).

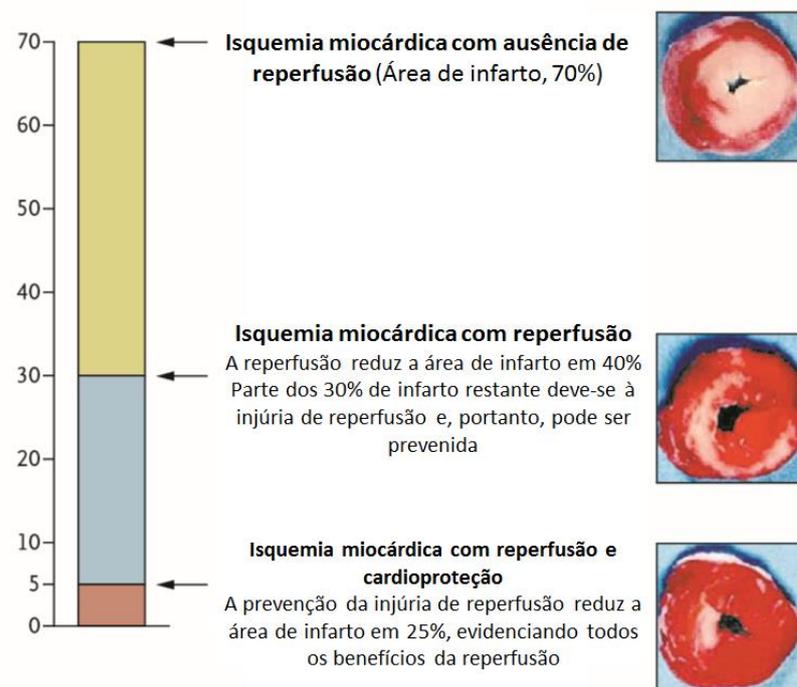


Figura 4 Contribuição da injúria de reperfusão na área de infarto final. ⁴

⁴ A reperfusão é uma abordagem terapêutica essencial para melhorar o prognóstico pós-infarto, contudo, a injúria provocada pela reperfusão, *per se*, é responsável por, aproximadamente,

A *priori*, o reestabelecimento abrupto do pH do meio extracelular gera um gradiente transmembranar extremo em relação à concentração de íons H^+ (Cohen *et al.* 2007). Por conseguinte, assim como na isquemia, o NHE transporta prótons para o meio extracelular, enquanto íons sódio são conduzidos para o meio intracelular intensamente (Fig. 5). Sincronicamente, o NCX favorece a extrusão íons sódio, em troca de íons cálcio, sustentando, novamente, o estabelecimento da sobrecarga sarcoplásmica de cálcio. Em suma, durante o desenvolvimento da injúria de isquemia/reperfusão, é possível observar dois picos na concentração de cálcio ocorrendo, primeiramente, após 15 minutos do início da isquemia e nos primeiros minutos da fase de reperfusão.

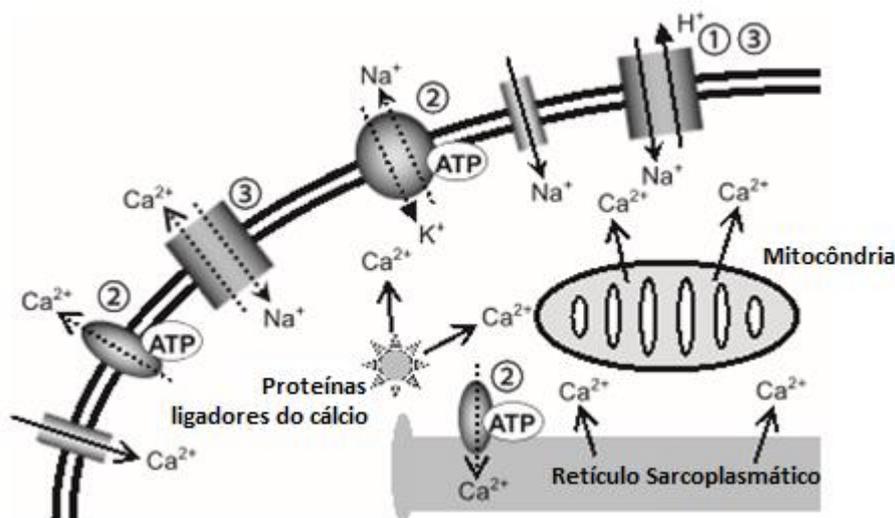


Figura 5 Trocas iônicas durante a reperfusão cardíaca, em cardiomiócitos.⁵

De fato, os efeitos mencionados anteriormente são semelhantes aos decorrentes ao longo do período de isquemia. Todavia, a célere normalização

15% da morte de cardiomiócitos decorrentes do processo de isquemia – reperfusão miocárdica. Adaptado de (Yellon e Hausenloy 2007).

⁵ 1) Aumento robusto na cinética do NHE, devido à abrupta reestabilização do pH extracelular; 2) Por sua vez, isto conduz à elevação, também robusto, na atividade no modo “reverso” do NCX; 3) Extrusão de cálcio para o meio extracelular e para o retículo sarcoplásmico é reestabilizada. Adaptado de (Sanada *et al.* 2011).

do pH intracelular resulta na desinibição de diversos eventos fisiopatológicos iniciados pelo cálcio (Fig.5) (Altschuld *et al.* 1981). Primeiramente, a sensibilidade da troponina C ao cálcio é restabelecida, o que suscita, de maneira abrupta e intensa, a elevação da pressão diastólica ventricular. Igualmente, a atividade proteolítica engendrada pela calpaína é, novamente, estimulada intensamente, porém, sem a atenuação exercida pelo pH ácido desta vez.

No intuito de atenuar a sobrecarga de cálcio, a mitocôndria passa a atuar como um tampão, através da intrusão deste íon via transportador uniporte (Zhang *et al.* 2006). No entanto, o cálcio, no ambiente mitocondrial, favorece a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como Bax e Bak, o que permite a formação e estabilização do poro de transição mitocondrial (PTM), (Misao *et al.* 1996; Narita *et al.* 1998; Davidson *et al.* 2011). Dentre os principais resultados da formação do PTM, destacam-se a perda de potencial da membrana interna mitocondrial, a tumefação e eventual ruptura desta organela. Além disso, há liberação de citocromo c, fator indutor de apoptose e proteína Smac, ambos capazes de ativar a via pró-apoptótica intrínseca, através do recrutamento das caspases (Borutaite *et al.* 2003; Loor *et al.* 2011; Guo *et al.* 2012). Em contrapartida, durante a isquemia, o pH ácido inibe a abertura do PTM, o que atenua as etapas mencionadas acima (Fig. 3). Além disso, em face da injúria mitocondrial, ocorre um aumento crítico na biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio, caracterizando o chamado “estresse oxidativo”.

1.2.4 ESTRESSE OXIDATIVO: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Essencialmente, o estresse oxidativo consiste em um quadro complexo no status *redox* da célula, caracterizado pela biodisponibilidade suprafisiológica de espécies reativas de oxigênio (ROS), em consequência do aumento na sua produção e/ou pela redução na sua depuração. O grupo de ROS inclui radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila, assim como

compostos como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), capazes de serem convertidos em radicais livres.

O O₂⁻ é sintetizado no meio intracelular, através da ativação das enzimas das famílias das Nox/Duox e xantina oxidase, pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase e pelo vazamento mitocondrial deste radical livre, naturalmente produzido na cadeia de fosforilação oxidativa, especificamente pelo complexo III (Loschen *et al.* 1974; Nakagami *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2003; Forteza *et al.* 2005; Satoh *et al.* 2005). Já o H₂O₂, oriundo da redução do ânion superóxido, pode gerar o altamente reativo radical hidroxila na presença de ferro, através da reação de *Fenton* (Doroshov e Davies 1986).

Em contraponto aos mecanismos supracitados, as células dispõem de artifícios antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os mecanismos enzimáticos, destaca-se a ação catalítica da superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Especificamente, a SOD catalisa o acréscimo de dois átomos de hidrogênio ao do O₂⁻, dando origem ao H₂O₂, como fora descrito anteriormente (Kettle *et al.* 1994). Subsequentemente, o H₂O₂ é convertido em água e oxigênio, tanto pela CAT, quanto pela GPx, encerrando-se a cascata de ROS (Nagababu *et al.* 2003).

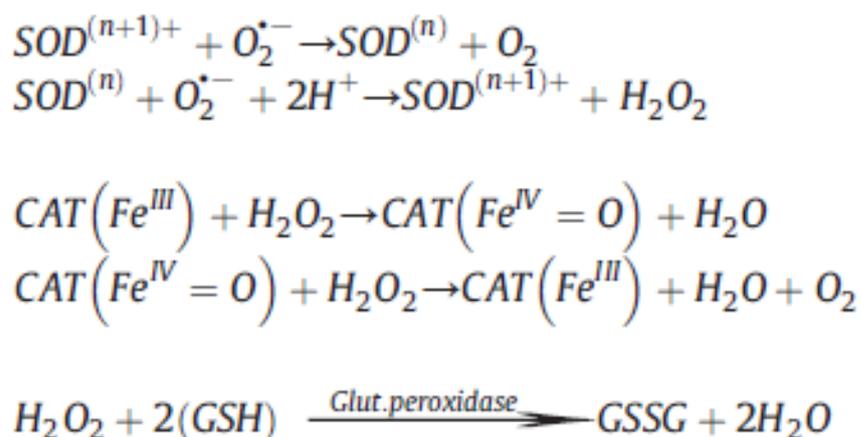


Figura 6 Ação das enzimas antioxidantes.⁶

⁶ Adaptado de (Raedschelders *et al.* 2012).

O papel fisiológico das ROS ainda é alvo de grande debate, sendo estas moléculas apontadas, por exemplo, como um dos mecanismos responsáveis pela sinalização metabólica mitocondrial, através da modulação na cinética do canal para potássio sensível ao ATP (Aon *et al.* 2003). Apesar da sua suposta importância fisiológica, estas moléculas tem sido reconhecidas pelo papel crítico no desdobramento da injúria de isquemia e, principalmente, na injúria de reperfusão (Fig.4).

Durante a isquemia, embora o nível tecidual de oxigênio seja significativamente reduzido, a afirmação de que não há formação de ROS é extremamente precipitada. A princípio, o nível de oxigênio durante este período não é nulo, frequentemente se mantendo entorno de 3-5 Torr (Xu *et al.* 2008). Deste modo, a produção de ROS, em níveis subletais, é passível de ocorrer. Condizente com esta ponderação, a anulação do oxigênio residual, durante a isquemia, favorece a sobrevivência de cardiomiócitos e melhora a recuperação das propriedades contráteis após a reperfusão *in vitro* (Hoek *et al.* 1997).

Dentre os mecanismos fisiopatológicos engendrados pelas ROS geradas na isquemia, destaca-se a peroxidação da cardiolipina, um lipídio presente na membrana mitocondrial, responsável pela estabilização do complexo IV da cadeia de fosforilação oxidativa, também conhecido como citocromo oxidase (Nicolay e De Kruijff 1987; Paradies *et al.* 2000). Deste modo, com a citocromo oxidase inibida, o citocromo c se mantém na forma reduzida, assim como os demais componentes da cadeia de fosforilação oxidativa precedentes (Paradies *et al.* 2000). Por conseguinte, este desequilíbrio favorece a redução do O₂ em O₂⁻ pelo complexo III (Loschen *et al.* 1974).

Como mecanismo de defesa na condição de estresse oxidativo mitocondrial, a mitocôndria dispõe da atividade antioxidante do citocromo c e a da SOD (Kettle *et al.* 1994; Zhao *et al.* 2003). Todavia, como fora mencionado anteriormente, o citocromo c, durante a isquemia, encontra-se prevalentemente em estado reduzido. Em contrapartida, parte do ânion superóxido produzido nesta condição é reduzido em H₂O₂ (Zhao *et al.* 2003). Portanto, fica caracterizado um ciclo, no qual o O₂⁻ provoca o aumento da sua própria síntese, ainda que de maneira modesta.

Por outro lado, devido ao abrupto reestabelecimento do fluxo sanguíneo, na reperfusão, a oferta de oxigênio tecidual aumenta abruptamente e, em face do prevalente estado reduzido da cadeia de fosforilação oxidativa, a produção de O_2^- e H_2O_2 aumenta. (Loor *et al.* 2011). Diante deste incremento excessivo na síntese de ROS, a maquinaria enzimática antioxidante não é capaz de reverter o quadro de estresse oxidativo celular. Conseqüentemente, as ROS colaboram para a abertura do PTM, e também alcançam o sarcoplasma, através do canal aniônico dependente de voltagem, para então oxidarem diversas estruturas intracelulares, como o DNA e os lipídeos sarcolemares, com danos irreversíveis (Davidson *et al.* 2011; Loor *et al.* 2011; Martindale e Metzger 2014).

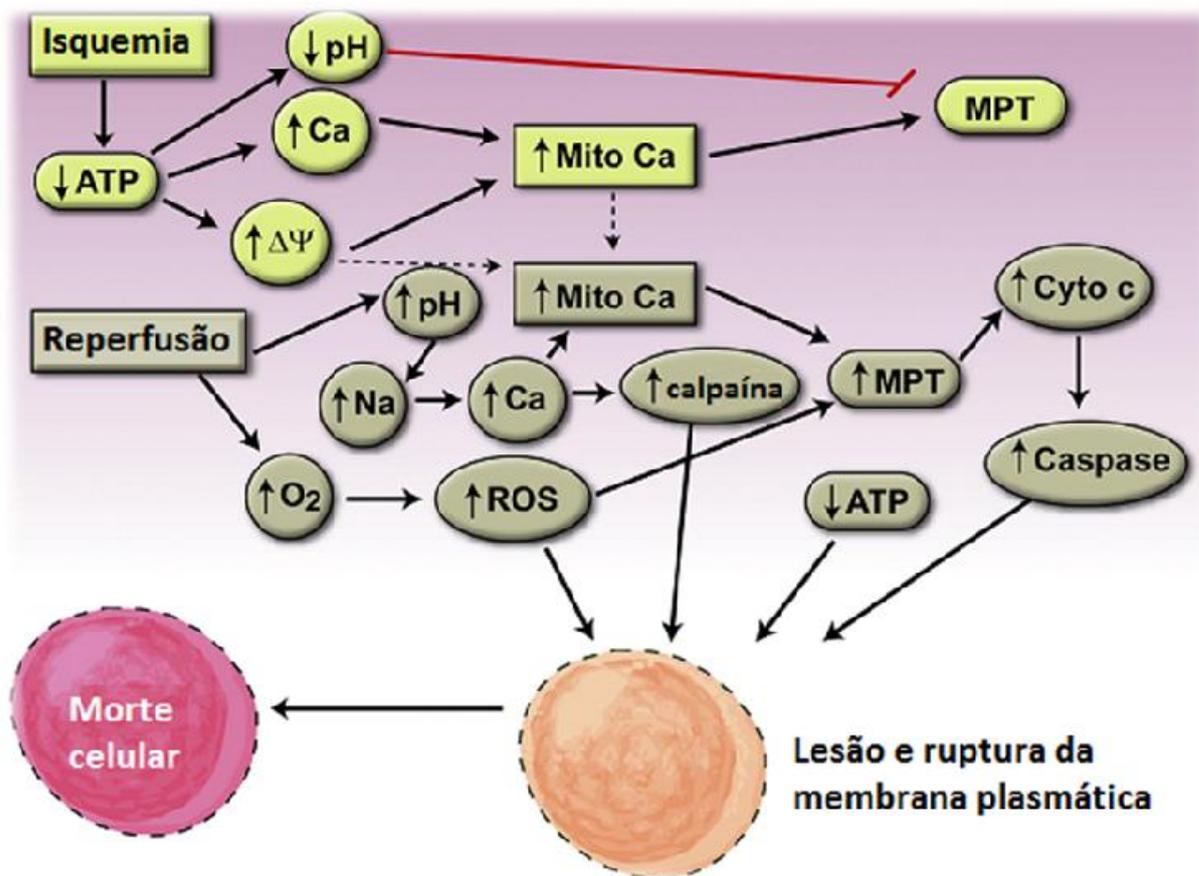


Figura 7 Mecanismos de morte celular atrelados à injúria de isquemia/reperfusão.⁷

⁷Mito Ca, cálcio mitocondrial; MPT, poro de transição mitocondrial; Cyto c, citocromo c; Ca, cálcio; Na, sódio; ROS, espécies reativas de oxigênio; Adaptado de Murphy & Steenbergen 2008

1.3 FATORES DE RISCO

A princípio, diversos fatores são capazes de interagir com as etapas da injúria de isquemia/reperfusão, o que indubitavelmente repercute na higidez do paciente pós-IAM. Envelhecimento, sedentarismo, predisposição genética, obesidade, hipertensão e *diabetes mellitus* são clássicos fatores capazes de aumentar a susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão e, assim, de agravar o infarto do miocárdio {Ferdinandy, 2007 #306}. Não obstante, o consumo desmedido de diversas substâncias tóxicas também é capaz de promover o mesmo efeito, destacando-se mercúrio, tabaco, etanol, cocaína e os esteroides anabólicos.

1.3.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS

Esteroides anabólicos são hormônios lipofílicos derivados do grupamento químico ciclopentanoperidrofenantreno do colesterol (Azhar e Menon 1981; Kubli-Garfias 1998). Nos homens, o esteroide anabólico predominante é a testosterona, sintetizada pelas células de *Leydig* testiculares (Payne *et al.* 1980). Por outro lado, nas mulheres, o hormônio dihidroepiandrosterona, um andrógeno menos potente secretado pelas adrenais em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico, é predominante, embora seja convertido em testosterona nos tecidos alvo (Morales *et al.* 1994; Endoh *et al.* 1996). Assim sendo, a testosterona pode ser convertida tanto em estradiol quanto em diidrotestosterona (DHT), pelas enzimas aromatase e 5 α -redutase, respectivamente (Simpson e Davis 2001). Tanto a testosterona quanto o seu metabólito DHT podem se ligar de maneira proeminente ao receptor de andrógenos, porém, a DHT apresenta maior afinidade e potência (Grino *et al.* 1989).

A maior parte da testosterona sérica é carregada pela albumina e, primordialmente, pela globulina transportadora de hormônios sexuais. Por outro lado, menos de 1% da testosterona circulante encontra-se na forma livre (Vermeulen *et al.* 1999). À vista disso, a testosterona sérica é rapidamente

convertida em substâncias menos potentes, e até mesmo inativas, pelos microsossomos hepáticos, com a velocidade máxima de 5,4 nmol.min⁻¹/mg de proteína (Patki *et al.* 2003).

Classicamente, os efeitos dos andrógenos são atribuídos aos seus receptores nucleares, cuja família também é composta pelos receptores para estrogênio, glicocorticoides, mineralocorticoides, progesterona, hormônios tireoidianos e ácido retinóico. Morfofuncionalmente, os receptores nucleares para andrógenos apresentam 4 domínios distintos: domínio de ligação ao ligante (DLL) que apresenta uma estrutura canônica entre os receptores nucleares, domínio de transativação amino-terminal, domínio de ligação para ácido desoxirribonucleico e a região da dobradiça (Jenster *et al.* 1995; Shaffer *et al.* 2004). Assim, quando o agonista acopla-se ao DLL, a ligação entre o receptor de andrógeno e as proteínas chaperonas que o mantém quiescente, como a proteína de choque térmico 90, se desfaz e ocorre dimerização do receptor (Kuil *et al.* 1995). Assim, o receptor é conduzido ao material genético da célula através de miofilamentos do citoesqueleto e, então, torna-se apto a promover sua atividade de transcrição através dos elementos responsivos aos andrógenos.

Recentemente, diversos estudos têm ressaltado o papel dos efeitos classificados como não genômicos. Esta classificação se baseia em critérios pré-estabelecidos, referentes à velocidade de alcance do efeito e a ausência de deslocamento do receptor ao núcleo. Deste modo, demonstrou-se que este receptor é capaz de ativar cascatas enzimáticas que culminam no recrutamento de fatores de transcrição, localizados preferencialmente em domínios citosólicos sub-membranares ricos em caveolina (Guo *et al.* 2002; Papakonstanti *et al.* 2003; Chignalia *et al.* 2012), assim como alterar a cinética de canais iônicos, como para o cálcio, potássio e sódio, de acordo com o fenótipo celular em questão (Ferrari *et al.* 1995; Gorczynska e Handelsman 1995; Ding e Stallone 2001; Vicencio *et al.* 2006)

As funções endócrinas atribuídas aos andrógenos começaram a ser, genuinamente, desenredados após observações de animais submetidos à orquiectomia e transplantes testiculares por John Hunter e, posteriormente,

Arnold Adolph Berthold (Dotson e Brown 2007b). Assim sendo, os efeitos destes hormônios foram classificados em androgênicos e anabólicos. Dentre os efeitos androgênicos, destaca-se o estabelecimento das características sexuais primárias e secundárias. Por outro lado, os efeitos anabólicos remetem, fundamentalmente, ao maior desenvolvimento de tecidos musculoesqueléticos. Notavelmente, o transplante testicular de doadores humanos e animais para pacientes com disfunção gonadal foi consolidado na medicina entre o final do século 19 e início do século 20 (Stanley 1920). Esta prática foi substituída somente após o isolamento molecular da testosterona e síntese dos seus derivados sintéticos, o que permitiu sua utilização terapêutica.

Neste contexto, é imprescindível ressaltar que o primeiro relato científico sobre os efeitos da administração de extratos testiculares em humanos veio à tona no final do século 19, através de estudos relatados à Sociedade de Biologia de Paris pelo fisiologista francês Charles Édouard Brown-Séquard (Brown-Séquard 1893). Embora outros cientistas não tenham sido capazes de reproduzir estes resultados por conta de divergências metodológicas, as observações de Brown-Séquard robusteceram as pesquisas na área da endocrinologia experimental e seus frutos viriam nos anos seguintes.

Por sua vez, a confecção dos derivados sintéticos da testosterona só foi possível após os estudos conduzidos no exórdio do século XX por Adolf Butenandt, Leopold Ruzicka e Ernest Laqueur que, no caso dos dois primeiros, foram laureados com o prêmio Nobel de Química em 1939 (Dotson e Brown 2007a). Desde então, diversas alterações químicas vêm sendo promovidas à molécula da testosterona para que os efeitos anabólicos sobressaiam sobre os efeitos androgênicos.

1.3.2 CONSUMO ILÍCITO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS

A aplicação dos derivados sintéticos da testosterona na medicina é consentida para o tratamento de doenças caracterizadas pelo *déficit* de testosterona, como hipogonadismo (Han e Bouloux 2010). Ademais, estes

fármacos também são indicados, frequentemente, para reverter o quadro de sarcopenia e, muitas vezes, caquexia, inerente às doenças crônicas debilitantes, como a síndrome da imunodeficiência adquirida e o câncer (Mulligan *et al.* 2005; Storer *et al.* 2005).

A despeito dos benefícios terapêuticos, o consumo de esteroides anabólicos passou a ser difundido entre atletas amadores e profissionais, no intuito de aprimorarem o desempenho e o aspecto físico. Os protocolos de utilização adotados por estes indivíduos variam bastante, sendo frequentemente caracterizados por regimes posológicos abusivos (Huie 1994; Maravelias *et al.* 2005; Pagonis *et al.* 2006; Parkinson e Evans 2006) .

No Brasil, a prevalência do consumo de esteroides anabolizantes entre outras drogas de utilização ilícita atinge 0,9% (Carlini 2007). Por conseguinte, é possível observar aumento de, aproximadamente, 30% no montante de indivíduos que relataram consumo de EA, em estudo precedente (Carlini *et al.* 2002). Além disso, é importante salientar que o consumo de anabolizantes supera o consumo de outras drogas ilícitas mais conhecidas dentro do âmbito da saúde pública, como o crack, heroína e merla (Carlini 2007).

Não obstante, diversos estudos conduzidos nas últimas décadas mostram uma preocupante prevalência de consumo de esteroides anabólicos entre adolescentes, em diversas nações (Durant *et al.* 1993; Nilsson 1995; Scott *et al.* 1996; Nilsson *et al.* 2001). De acordo com o *National Institute of Drug Abuse*, o consumo de esteroides anabolizantes, entre estudantes do ensino fundamental e médio, pode atingir cerca de 2,5%, estando, portanto, próximo dos números referentes ao consumo de cocaína e *crack* (Johnston *et al.* 2010).

No Brasil, o consumo de EA somente entre adolescentes supera em cerca de 55% a prevalência do consumo na população em geral. Aproximadamente 1,4% dos 50.890 estudantes dos ensinos fundamental e médio entrevistados relataram o consumo de EA (Carlini 2011). Assim, foi possível constatar aumento de 40% na quantidade de jovens que relataram o consumo de EA, em comparação com estudos precedentes (Carlini 2005). Neste contexto, o percentual supracitado supera os números associados ao

consumo de outras drogas mais enfatizadas no contexto de saúde pública, como *crack* (0,6%), analgésicos opiáceos (0,6%), ópio/heroína (0,3%), LSD (1,0%) e ecstasy (1,3%) (Carlini 2011). Em relação à duração do tratamento, a maior parte (35,71%) utilizou EA durante 12 a 90 dias, enquanto 12,86 % atingiram um ano de tratamento (Carlini 2007).

1.3.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DOS EA SOBRE AS DCV

Fundamentalmente, os hormônios sexuais masculinos promovem diversas alterações no *modus operandi* do sistema cardiovascular, direta e indiretamente. Este paradigma, *per se*, confere diferenças no desenvolvimento de cardiopatias entre homens e mulheres. Assim, concernente ao infarto do miocárdio, é possível observar que homens desenvolvem IAM cerca de 10 anos mais cedo do que as mulheres (Go *et al.* 2013; Mozaffarian *et al.* 2015). Ademais, a mortalidade entre homens é superior à mortalidade entre mulheres (Fig. 8), embora a sobrevivência pós-infarto seja superior entre pacientes do sexo masculino (Mendis *et al.* 2011; Mozaffarian *et al.* 2015).

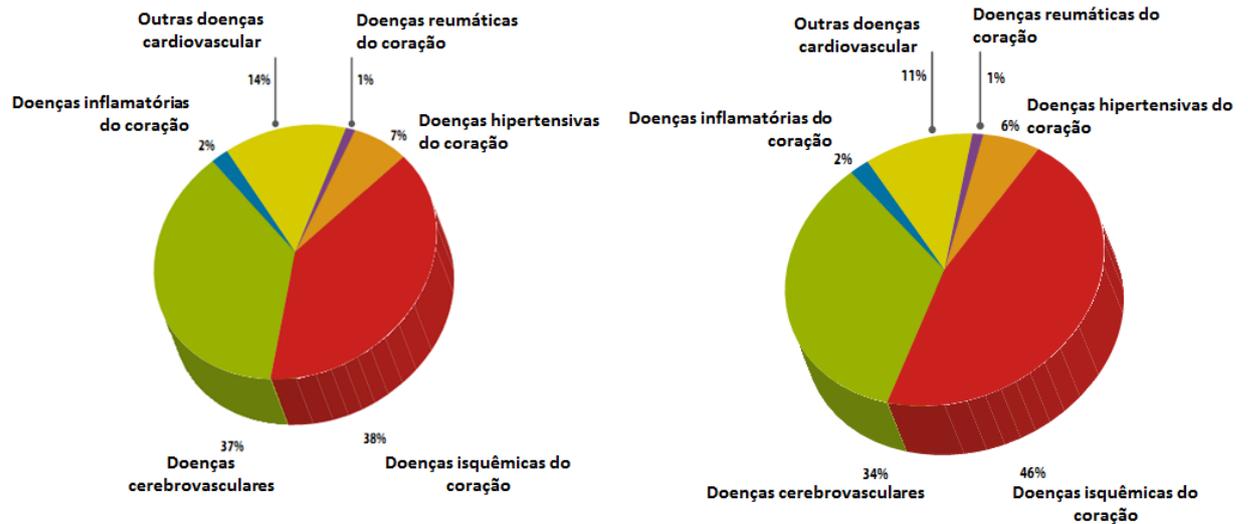


Figura 8 Dimorfismo sexual atrelado à mortalidade atrelada às doenças cardiovasculares.⁸

Experimentalmente, diversos estudos mostram que corações de roedores do gênero masculino são menos resilientes frente ao episódio isquêmico, em relação às fêmeas. Esta condição é ilustrada pela menor recuperação das velocidades de contração e relaxamento do VE em machos, ao final da reperfusão cardíaca, em modelos de isquemia - reperfusão *ex vivo* (Huang *et al.* 2010; Bell *et al.* 2011). Da mesma forma, a incidência de episódios arrítmicos e a extensão da área de infarto também são, significativamente, superiores nos corações de roedores machos (Brown *et al.* 2005; Lagranha *et al.* 2010; Bell *et al.* 2011).

A princípio, muitos autores justificam que a menor letalidade relacionada ao IAM, no sexo feminino, está associada ao efeito cardioprotetor do estrogênio. Todavia, tanto a orquiectomia, quanto o bloqueio dos receptores para andrógenos potencializam a recuperação da pressão desenvolvida pelo VE, a pressão diastólica final do VE e as velocidades de contração e relaxamento do VE, ao longo da reperfusão cardíaca, em corações isolados (Wang *et al.* 2005; Huang *et al.* 2010).

⁸ Estatisticamente, homens (direita) morrem mais por conta de infarto do miocárdio do que mulheres (esquerda), sendo possível destacar fatores fisiológicos, sociais e culturais interagindo para justificar esta observação. Adaptado de (Mendis *et al.* 2011).

Corroborando os dados em corações isolados, a orquiectomia também se correlaciona com a manutenção da pressão arterial, da frequência e do ritmo cardíaco, *in vivo*, após ligadura da artéria coronária esquerda em ratos *Wistar* machos (Pavón *et al.* 2012). Além disso, a desorganização das fibras cardíacas provocada pela injúria de isquemia/ reperfusão é significativamente maior em machos falso-operados para orquiectomia (Pavón *et al.* 2012).

Tendo em vista que a testosterona, em nível fisiológico, inflige riscos consideráveis em face do infarto do miocárdio, e que o consumo de esteroides anabolizantes é relevante no Brasil e em outras nações, é fundamental erguer a discussão em torno dos efeitos da sobrecarga destes fármacos sobre o sistema cardiovascular. Deste modo, é importante salientar a alta ocorrência de disfunções cardiovasculares associadas ao consumo ilícito de EA, como infarto do miocárdio, hipertrofia cardíaca e morte súbita (Kennedy e Lawrence 1993; Ahlgrim e Guglin 2009; Luijkx *et al.* 2013).

Estudos demonstram que consumidores de EA amiúde apresentam hipertrofia cardíaca marcada por aumento da espessura da parede posterior do VE e do septo interventricular, o que caracteriza a elevada massa do VE (Urhausen *et al.* 1989; Sachtleben *et al.* 1993). De fato, em roedores e cães, é possível observar significativo aumento do peso cardíaco e do índice cardíaco, após administração crônica de EA. Não obstante, a microestrutura miocárdica é marcada por hipertrofia dos cardiomiócitos e elevada deposição de colágeno (Takala *et al.* 1991; Rocha *et al.* 2007; Franquini *et al.* 2013). Portanto, estas alterações ilustram o fenótipo cardíaco marcado por fibrose focal e generalizada, sendo isto, de fato, uma característica comum no remodelamento cardíaco em consumidores de EA (Kennedy e Lawrence 1993). Parte deste remodelamento pode ser associada à eventual sobrecarga hemodinâmica observada em usuários de EA (Alves *et al.* 2010), no entanto, não existem dados conclusivos quanto aos mecanismos pró-hipertroficantes associados a estes fármacos.

Além disso, a microscopia eletrônica dos cardiomiócitos de roedores tratados cronicamente com EA revela lesões mitocondriais e sarcoméricas no miocárdio (Appell *et al.* 1983), o que sugere alterações nocivas no metabolismo

energético cardiomiocitário, assim como na sua capacidade contrátil. Outrossim, Tagarakis e colaboradores demonstraram que a neovascularização promovida pelo exercício em ratos *Wistar* é inibida após a sua exposição à esteroides anabólicos (Tagarakis *et al.* 2000). Junto à elevada demanda energética inerente aos cardiomiócitos hipertróficos, o suprimento de oxigênio torna-se insuficiente, o que favorece episódios de isquemia, sobretudo durante o exercício (Sullivan *et al.* 1998; Friehs e Del Nido 2003).

Além do aludido remodelamento estrutural, os esteroides anabólicos também são capazes de promover um conjunto de distúrbios eletrofisiológicos no coração. Estudos prévios demonstram que a administração crônica de EA, em ratos *Wistar*, reduz de forma relevante a densidade da corrente de potássio transiente de efluxo e a expressão de subunidades dos canais que conduzem esta corrente, em cardiomiócitos ventriculares (Medei *et al.* 2010; Tanno *et al.* 2011). Isto configura um prolongamento do potencial de ação dos cardiomiócitos ventriculares e, assim, do intervalo QT (Medei *et al.* 2010; Tanno *et al.* 2011). Ademais, isto também justifica o aumento da ocorrência de arritmias cardíacas em usuários de EA, com prevalência de aumento na dispersão do intervalo QT (Sullivan *et al.* 1999; Maior *et al.* 2010). Por conseguinte, isto repercute no elevado risco de morte súbita em usuários de EA (Maron 2003).

Também é possível observar alterações relevantes no que tange ao controle autonômico do sistema cardiovascular, após a administração crônica de EA. Deveras, através de eletromiografia, evidenciou-se que o consumo desmedido de EA conduz à maior atividade simpática em seres humanos e isto, por sua vez, está consociado à elevação da pressão arterial, além de ser um risco proeminente no desenvolvimento de arritmias cardíacas (Alves *et al.* 2010). Corroborando este aspecto, os EA acarretam lesões análogas à miocardite adrenérgica em roedores (Fanton *et al.* 2009), o que sugere aumento da atividade simpática direcionada ao coração.

Dentro deste contexto, nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que a exposição aos EA durante a fase púbere promove efeitos sobre a regulação do sistema cardiovascular, que persistem até a fase adulta. Basicamente, o

tratamento com altas doses de propionato de testosterona, restrito à fase adolescente, configura desequilíbrio autonômico, caracterizado por aumento na prevalência da atividade simpática, que persiste ao longo da fase adulta (Olivares *et al.* 2014).

Com base nos efeitos nocivos que os EA provocam sobre o sistema cardiovascular, não é surpreendente que o consumo abusivo destes fármacos interfira de forma negativa sobre o desdobramento da injúria de isquemia/reperfusão e, portanto, sobre o prognóstico pós-infarto. De fato, a administração crônica de EA em ratos *Wistar* aumenta, significativamente, a susceptibilidade ao estresse oxidativo e a extensão da área de infarto em corações isolados (Chaves *et al.* 2006). Ademais, as propriedades contráteis do coração também são relevantemente afetadas, uma vez que a recuperação da pressão desenvolvida pelo VE, durante a fase de reperfusão, é reduzida após a sobrecarga de EA, em ratos *Wistar* adultos (Chaves *et al.* 2006; Penna *et al.* 2011).

A despeito dos dados mencionados, pouco se sabe sobre os efeitos da administração de doses supra-fisiológicas de EA sobre sistema cardiovascular, desde o nível celular e molecular, até à integração fisiológica como um todo. Além disso, os estudos experimentais que associam a administração de EA e o IAM se restringem, até o momento, a aplicação durante a fase adulta, ainda que o consumo durante a adolescência seja frequente. Portanto, objetivou-se, com o presente estudo, avaliar, pela primeira vez, a susceptibilidade à injúria de isquemia/ reperfusão na fase adulta, através da análise das propriedades elétricas e mecânicas de corações isolados em aparato de *Langendorff*, após administração prévia de EA durante a fase adolescente, em ratos *Wistar* machos.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliação da susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão em corações isolados, na fase adulta, após tratamento prévio com EA, ao longo da adolescência, em ratos *Wistar* machos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os seguintes parâmetros em corações isolados de ratos *Wistar* adultos, em modelo de injúria de isquemia/reperfusão *ex vivo*, após sobrecarga crônica com propionato de testosterona, ao longo da fase adolescente:

- Analisar as propriedades mecânicas do coração;
- Avaliar a incidência de episódios arrítmicos;
- Averiguar eventual hipertrofia cardíaca;
- Verificar eventual congestão, através dos pesos relativos dos pulmões, rins e fígado;
- Analisar o padrão de expressão gênica;
- Verificar o *status* da maquinaria antioxidante e oxidante, através da atividade das enzimas NADPH oxidases e dual oxidases, e expressão gênica de SOD1, SOD2, SOD3, GPx1, GPx3 e CAT;
- Aferir a dimensão da área de infarto.

3 JUSTIFICATIVA

Fundamentalmente, os efeitos fisiológicos da testosterona sobre o sistema cardiovascular estão sendo elucidados, pouco a pouco. No entanto, o conhecimento a respeito dos efeitos atrelados à sobrecarga de EA sobre o sistema cardiovascular e, ainda mais, sobre as síndromes cardiovasculares, é, criticamente, tênue.

Não obstante, a grande maioria dos estudos, até o presente momento, dispôs-se a averiguar os efeitos cardiovasculares dos EA, consumidos já na fase adulta, de modo que pouco se sabe em relação aos efeitos do consumo na adolescência, ainda que, epidemiologicamente, seja, relevantemente, alto. A princípio, nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que a administração de EA, somente ao longo da fase adolescente, favorece o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares, caracterizadas por desequilíbrio autonômico, além de alterações comportamentais e hidroeletrólíticas, que persistem durante a fase adulta (Olivares *et al.* 2014). Por conseguinte, é natural elucubrar-se a respeito de uma possível ingerência fisiopatológica da administração de EA, ao longo da adolescência, sobre o desdobramento da injúria de isquemia/reperfusão, na fase adulta. Assim sendo, espera-se, com o presente estudo, fomentar o arcabouço científico-experimental necessário para melhorar, junto com estudos vindouros e já existentes, o prognóstico pós-infarto de indivíduos adultos que consumiram EA ao longo da adolescência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos com 26 dias de vida (~110 gramas). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (21 °C ~ 22 °C) e exaustão 24 horas por dia. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 – 18:0 e 18:00 – 6:00, respectivamente) e tiveram livre acesso à ração e água filtrada. O protocolo experimental está sob vigência da Comissão de Avaliação do Uso de Animais do Instituto de Biologia (processo 007/2015).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram, aleatoriamente, distribuídos em dois grupos experimentais (Fig.9): grupo EA, cujo tratamento consistiu em propionato de testosterona (®Hertape Calier) por via intramuscular, na dose de 5 mg . kg⁻¹ /dia, 5 dias por semana; grupo controle (CTL), cujo tratamento consistiu em óleo de milho, diluído em álcool benzílico (90 : 10, v/v), em volume e frequência correspondentes. Os tratamentos foram estendidos por 5 semanas, a partir do 26º dia pós-natal (P26). Após o último dia de administração, os animais ficaram 3 semanas sem tratamento algum. Ao final da terceira semana, foi avaliada a suscetibilidade à injúria de isquemia / reperfusão em corações isolados, através do modelo de perfusão artificial com o aparato de *Langendorff*.

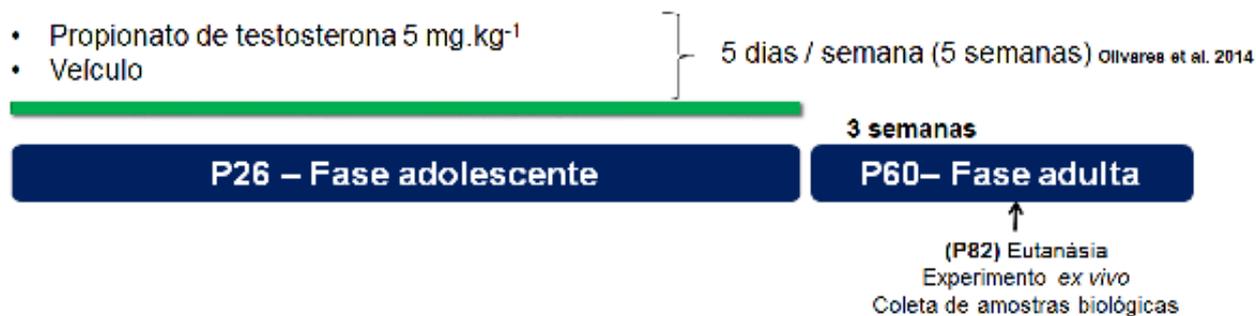


Figura 9 Protocolo experimental.⁹

4.3 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

Para a confecção dos dados de morfometria, os animais foram pesados antes da submissão à eutanásia. Coração, rins, fígado, pulmões e testículos foram coletados e, devidamente, pesados, após a eutanásia por decapitação. Deste modo, foi possível calcular o peso relativo dos órgãos supracitados, sendo expressos em mg de órgão por peso corporal em g.

4.4 PREPARAÇÃO DOS CORAÇÕES ISOLADOS

Para o desenvolvimento da análise morfofuncional dos corações isolados, os ratos foram, previamente, submetidos a eutanásia por decapitação. Os corações foram, prontamente, removidos e conectados ao aparato de *Langendorff*, através da inserção de uma cânula na aorta, com fluxo constante de 10 mL.min⁻¹. A solução de perfusão artificial utilizada foi a de *Krebs-Henseleit* (KHB) modificada, contendo (em mM): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glicose, 1,8 CaCl₂, saturada com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂). A solução foi ajustada para o pH 7,4 e mantida aquecida em 37 °C, sendo bombeada pelo circuito através da bomba de perfusão.

⁹ O protocolo experimental adotado no presente estudo foi adaptado do protocolo publicado no estudo de Olivares e colaboradores (Olivares *et al.* 2014).

Em seguida, um balão de látex conectado a uma cânula e a um transdutor de pressão foi inserido no ventrículo esquerdo, através de uma incisão no átrio esquerdo. O volume do balão, previamente preenchido com água, foi ajustado para manter a pressão diastólica final em 10 mmHg. O transdutor foi conectado a um amplificador ML110, para registro da pressão intraventricular desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. Os registros de pressão foram digitalizados por uma interface analógico-digital (*PowerLab 400, ADInstruments*) e armazenados em um computador para análise off-line com o software *Chart 7 (ADInstruments)*.

Por fim, três eletrodos (positivo, negativo e terra), foram imersos na solução do banho ao qual o coração foi mantido. Deste modo, foi possível acessar o registro eletrocardiográfico dos corações isolados e, assim, analisar a incidência de episódios arrítmicos durante os registros.

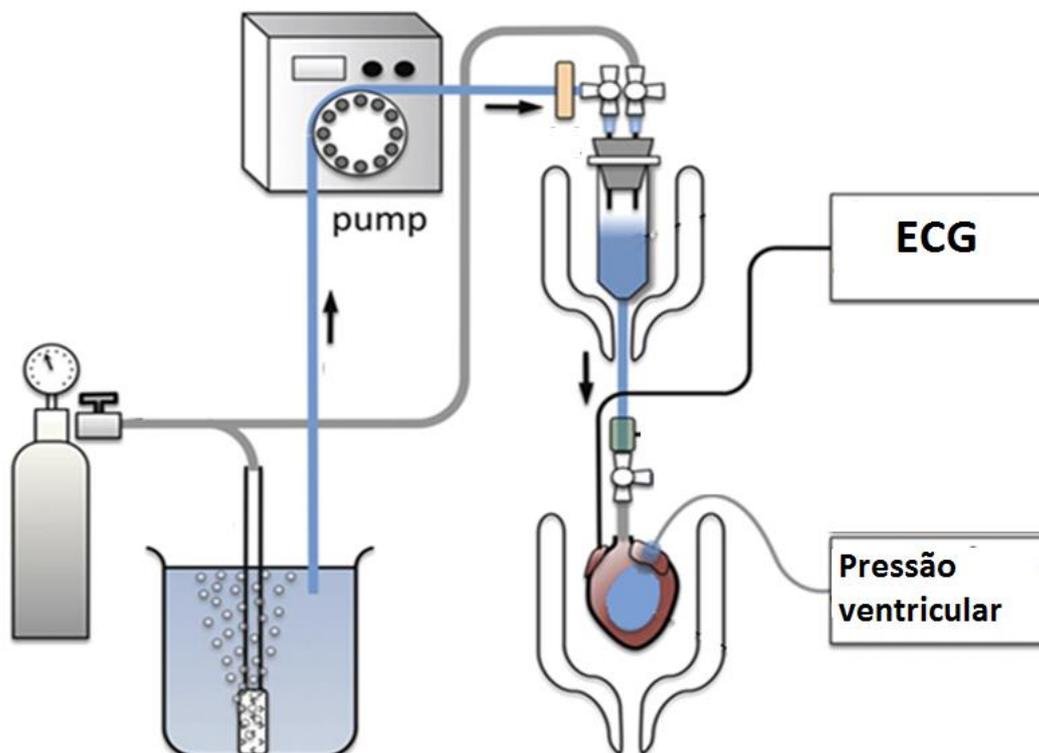


Figura 10 Aparato de Langendorff.¹⁰

¹⁰ Desenho esquematizando a perfusão artificial *ex vivo* de um coração isolado, em aparato de *Langendorff*. Adaptado de (Liao *et al.* 2012).

4.5 PROTOCOLO DE ISQUEMIA / REPERFUSÃO

Após a inserção do balão no ventrículo esquerdo, os corações foram deixados 20 minutos em adaptação, seguidos de 30 minutos de isquemia global e 60 minutos de reperfusão global. Ao final do protocolo, a porção ventricular dos corações foi segmentada a cada 3 mm e incubada em cloreto trifeníl tetrazólio 1% (TTC). Em seguida, os fragmentos foram mantidos durante 24 h em formaldeído 10% (v/v), no intuito de melhorar o contraste colorimétrico entre a área de infarto e o miocárdio viável. Assim sendo, os cortes inerentes aos ventrículos foram alocados entre duas placas de vidro e, então, suas imagens foram digitalizadas através de escâner. A área de infarto foi determinada através de morfometria, utilizando-se o software *ImageJ*. Os valores foram expressos em % da área total.

4.6 ÍNDICE DE SEVERIDADE DE ARRITMIAS

Arritmias cardíacas foram definidas como a presença de batimentos ventriculares prematuros (BVP), taquicardia ventricular, *flutter* ventricular e fibrilação ventricular, no registro eletrocardiográfico. Deste modo, as arritmias foram classificadas quanto ao tipo, recebendo diferentes pontuações para a análise qualitativa (Bernauer e Ernenputsch 1988; Ferreira *et al.* 2001). O aparecimento de 1 – 9 BVP configura 1 ponto; >10 BVP, 2 pontos; taquicardia ventricular / *flutter* ventricular, 3 pontos; fibrilação ventricular, 4 pontos. Arritmias repetidas (exceto BVP), não foram contabilizadas na pontuação final de cada coração (Por ex: Se o coração apresentou 12 BVP e 2 episódios de fibrilação ventricular, a pontuação final dele foi 6 pontos [2 pontos referentes aos BVP e 4 pontos referentes ao aparecimento de fibrilação]).

4.7 REATIVIDADE DA AORTA

A metodologia utilizada para esta etapa foi baseada no estudo de Mulvany e Halpern (Mulvany e Halpern 1977). Segmentos anelares de aorta torácica foram alocados em um miógrafo (DMT Model 620M, Dinamarca), conectado ao sistema para aquisição e análise de dados (*Powerlab 8/36*, e programa *PowerLab 7-Pro - AD Instruments*, Austrália). Os anéis de aorta foram, então, mantidos em solução de *Krebs-Henseleit*, continuamente aeradas com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) a 37 °C. Após o período de adaptação de 1 hora, no qual a preparação foi constantemente estirada visando à manutenção da tensão muscular em 1 g, os anéis de aorta foram pré-contraídos com a adição de 10 µM de fenilefrina, seguido da aplicação de 10 µM de acetilcolina, para avaliar a funcionalidade do tecido. Subsequentemente, após 30 min de lavagem da preparação e retorno da tensão para os valores basais, foram aplicadas doses crescentes de fenilefrina (1 nM a 10 µM), no intuito de se avaliar a capacidade vasoconstrictora do tecido. Após atingir um platô de contratatura, na concentração mais alta de fenilefrina, concentrações crescentes de acetilcolina foram aplicadas ao meio (1 nM a 10 µM), para avaliar a capacidade vasodilatadora do tecido. Todos os sinais foram digitalizados e armazenados para posterior análise.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.8.1 EXTRAÇÃO DO RNA

A extração do RNA total seguiu as instruções do fabricante do kit utilizado (*RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit*, QIAGEN®). Para tanto, foram utilizadas, aproximadamente, amostras de 30 mg do ventrículo esquerdo dos animais tratados com EA (N = 6) OU veículo (N = 5). A homogeneização das amostras foi realizada em 300 µL de tampão RLT contendo β-mercaptanol e,

então, foi promovida com um rotor elétrico. Subsequentemente, foram adicionados 590 μL de água livre de RNase e 10 μL de solução contendo proteinase K e, então, todas as amostras foram incubadas 55 °C por 10 minutos sendo, em seguida, centrifugadas a 25 °C por 3 minutos a 10000 x g.

Ao sobrenadante deste procedimento foi adicionado 0,5 volume de etanol (100%) e, então, 700 μL de cada amostra foram alocados à colunas de rotação do kit, encaixadas em microtubos de 2 mL. Assim, as amostras foram centrifugadas a 25 °C por 15 segundos a 8000 x g descartando-se o volume escoado, sendo as duas ultimas etapas repetidas. Após adição de 350 μL de tampão RW1 às colunas, as amostras foram, novamente, centrifugadas a 25 °C para 15 segundos a 8000 x g, para lavar as membranas, descartando-se o fluido escoado. Em seguida, foi misturado às amostras 80 μL de solução contendo DNase I (10 μL) e tampão RDD (70 μL), sendo, subsequentemente, mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos.

Acrescentou-se 350 μL de tampão RW1 às colunas e, então, as amostras foram novamente centrifugadas a 25 °C por 15 segundos a 8000 x g, descartando-se o fluido escoado. Assim, 500 μL de tampão RPE foram adicionados às amostras, promovendo-se, novamente, centrifugação a 25 °C por 2 minutos a 8000 x g. Subsequentemente, as colunas foram alocadas para microtubos de 1,5 mL, adicionou-se água livre de RNase e, então, as amostras foram centrifugadas a 25 °C por 1 minuto a 8000 x g. Enfim, as colunas foram, novamente, alocadas em microtubos de 1,5 mL, repetindo-se a centrifugação nas mesmas configurações da etapa anterior.

4.8.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO RNA

Para mensurar a concentração do RNA total, a absorbância, em comprimento de onda de 260 nm (A260), foi aferida por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific). Deste modo, foi possível estimar a pureza do RNA, por meio das relações A260:A280 e A260:A230, haja visto que razões

baixas sugerem a presença de contaminantes oriundos, principalmente, dos *kits* utilizados. Com base nesta premissa, as amostras que apresentaram relação A260:A280 entre 1,9 e 2,1 e a relação A260:A230 entre 2,0 e 2,2 foram consideradas aptas.

Em contrapartida, as demais amostras foram submetidas ao processo de precipitação. Para tanto, foi adicionado acetato de sódio (0,1 volume a 3 M), etanol (2,5 volumes a 100%) e glicogênio (1 μ L). Subsequentemente, todas as amostras foram, devidamente, homogeneizadas e incubadas em -80°C . No dia seguinte, as amostras foram submetidas à centrifugação (25000 x g por 20 minutos em temperatura ambiente), e, assim, o sobrenadante foi descartado, enquanto os precipitados foram suspensos em água livre de RNAses, repetindo-se, desta maneira, a quantificação do RNA.

4.8.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para promover a reação em transcriptase reversa, foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)*. Desta forma, a combinação composta por 2 μ L de 10x RT Buffer, 0,8 μ L de 25 x dNTP Mix, 2 μ L de 10x RT Random Primers, 3,2 μ L de água livre de nuclease e 1 μ L de inibidor de RNase foi, devidamente, homogeneizada em 1000 ng de RNA total, previamente diluído em 10 μ L de água livre de nuclease. Em seguida, as amostras foram alocadas no termociclador (*MJ Research PTC-100 Thermal Cycler*), para favorecer o desdobramento das reações, mediante a seguinte programação: 5 minutos a 65°C e, subsequentemente, acréscimo de 1 μ L de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase*, seguido de 10 minutos a 25°C , 2 horas a 37°C e 5 minutos a 85°C . Por fim, o cDNA foi armazenado a -20°C .

4.8.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

A amplificação dos produtos dos mRNA foi promovida pelo *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), especificamente, por meio da enzima *DNA Polymerase (AmpliTaq Gold®)* e dos demais componentes necessários à reação. Para tanto, 7,5 µL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, 0,6 µL da mistura de *primers* senso e reverso a 10 µM (Invitrogen) para, respectivamente, MHCα, MHCβ, BNP, RyR, SERCA2a, SOD1, SOD2, SOD3, GPx1, GPx3 e CAT, 1 µL de cDNA diluído 50 vezes e 5,9 µL água livre de nuclease, foram homogeneizados, totalizando 15 µL. Por sua vez, o GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Enfim, a ciclagem foi realizada no equipamento *Applied Biosystems®Viia 7 Real-Time PCR*, utilizando-se o software *Viia 71.2.1* no modo de corrida *Standard*, e através do ciclo de 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1min a 60°C.

Tabela 1 Sequência dos *primers* utilizados

αMHC	F	CAC CAG AAT CCA GGC TCA AG
	R	TCA TCC ACG GCC AAT TCT TG
βMHC	F	CCA TCA ACG ACC CCT TCA TT
	R	GAC CAG CTT CCC ATT CTC AG
GAPDH	F	ACA ACC CCT ACG ATT ATG CG
	R	CGC CTG TCA GCT TGT AAA TG
SOD1	F	TGTGTCCATTGAAGATCGTGTG
	R	CTTCCAGCATTTCAGTCTTTG
SOD2	F	GGACAAACCTGAGCCCTAAG
	R	CAAAGACCCAAAGTCACGC
SOD3	F	GACCTGGAGATCTGGATGGA
	R	GTG GTT GGA GGT GTT CTG CT
GPx1	F	AAT CAG TTC GGA CAT CAG GAG
	R	GAA GGT AAA GAG CGG GTG AG
GPx3	F	CAGCTACTGAGGTCTGACAG
	R	ACTAGGCAGGATCTCCGAG
CAT	F	CAAGCTGGTTAATGCGAATGG
	R	TTGAAAAGATCTCGGAGGCC
Ryr	F	TCACTGAGAAGCCAAGACCG
	R	TCCGTGGGTGGTATGGTAGA
BNP	F	CTTTCCTTAATCTGTGCCG

	R	GTCTCTGAGCCATTTCTCTG
SERCA2a	F	ATGTAAGGGTGTTCGGGTGC
	R	ACATCACACAGTGAGCTGGG

4.9 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.9.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE VE

As amostras de tecido cardíaco (Ventrículo esquerdo) dos grupos experimentais permaneceram a 4 °C por 24 horas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,2), contendo sacarose 0,25 M, ditioneitol (DTT) a 0,5 mM, ácido tetraacético etileno glicol (EGTA) a 1 mM, aprotinina 5 mg/mL e fluoreto de fenil sulfonil metano (PMSF) 34,8 mg/mL, antes da homogeneização. Assim, as amostras foram homogeneizadas no tampão supracitado, em gelo, através de homogeneizador de vidro. Subsequentemente, o composto homogenado foi centrifugado a 4 °C por 35 minutos a 100000xg, em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH7,2) contendo sacarose a 0,25 M, MgCl₂ a 2 mM, aprotinina 5 mg/mL e PMSF 34,8 mg/mL. As amostras foram, então, armazenadas a -70 °C. A concentração de proteína nas amostras foi mensurada pelo método de Bradford (Bradford 1976).

4.9.2 ATIVIDADE DE DUOX E NOX

As amostras contendo 10 µg de proteína foram adicionadas a uma placa de 96 poços, na qual cada amostra ocupava dois poços na placa, um com CaCl₂ e um sem CaCl₂. Assim, cada poço recebeu 10 µl água, tampão A2 (tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,2, MgCl₂ 2mM, sacarose 0,25 M e inibidores de proteases) e composto com ou sem CaCl₂. O composto consiste de uma solução contendo EGTA 0,1 M, CaCl₂ 0,1 M (no caso do mix com CaCl₂) ou volume equivalente de água (no caso do mix sem CaCl₂), tampão fosfato de sódio 0,3 M pH 7,2, 2,1 µl de água Mili Q, superóxido dismutase

(SOD) 20000 U/ml, peroxidase de raiz forte (HRP) 25 U/ ml e Amplex Red 10 mM.

Foi feita, também, uma curva de peróxido de hidrogênio, na qual são utilizadas concentrações crescentes de H₂O₂: 0, 2μM, 4μM, 6μM e 8μM. Também foi feito um mix para a curva de peróxido, na qual foi utilizado tampão A2, composto com CaCl₂ e NADPH (1mM), que foi adicionado a cada ponto da curva. Feito isso, adicionou-se NADPH a cada poço da placa contendo as amostras e a fluorescência foi mensurada no espectrofluorímetro por, aproximadamente, 40 minutos (Victor®). O comprimento de onda de excitação empregado foi de 530nm e de emissão de 595nm. Enfim, a geração de H₂O₂ foi determinada usando-se a curva de calibração e os resultados foram expressos como nanomoles de H₂O₂ por hora por mg de proteína (nmol H₂O₂.h⁻¹.mg de ptn⁻¹).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados não temporais (Área de infarto, peso relativo dos órgãos, produção de H₂O₂ e índice de severidade de arritmias) foram analisados através do teste t de *Student*. Por outro lado, os dados referentes à função ventricular (Pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo, primeira derivada de pressão positiva e negativa, pressão diastólica e sistólica, frequência cardíaca intrínseca) foram analisados através de ANOVA *two-way* com pós – teste de *Bonferroni*.

Em relação à análise molecular, utilizou-se o teste *t* de *student*. Para tanto, os dados utilizados consistiram nos valores de 2^{-ΔΔCT} de cada amostra dos grupos controle, em relação à média do próprio grupo. No caso dos grupos experimentais, as análises foram realizadas utilizando-se valores de 2^{-ΔΔCT} de cada amostra experimental em relação à média dos ΔC_{Ts} do grupo controle, todos transformados para escala logarítmica na base 10. Utilizou-se a escala logarítmica para não subestimar os dados, no caso de existir redução da expressão do alvo, visto que, em escala linear, essa diminuição gera valores

entre 0 e 1, enquanto o aumento da expressão pode gerar valores de 1 a ∞ . Todos os dados do presente estudo foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL E PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS

A administração crônica de propionato de testosterona, nos moldes do modelo estipulado pelo nosso grupo, não alterou o peso corporal dos ratos de maneira relevante. Apesar disso, foi possível observar redução no peso relativo testicular, o que indica que o tratamento foi eficaz em inibir o eixo hipotálamo – hipófise – testículos, favorecendo o desenvolvimento de atrofia testicular. Os animais tratados com EA também apresentaram aumento do peso total e peso relativo do coração, indicando remodelamento cardíaco caracterizado por hipertrofia. Não foi possível observar diferenças significativas no que tange aos pesos relativos pulmonar, hepático e renal (Tabela 1).

Tabela 2 Dados Morfométricos.¹¹

	Grupo Controle	Grupo EA	Significância
Peso corporal (g)	269,8 ± 7,679	265,0 ± 8,966	NS
Peso cardíaco (g)	1,245 ± 0,03879	1,658 ± 0,08511	***P < 0,001
Peso relativo cardíaco (mg/g)	4,733 ± 0,1802	6,528 ± 0,3550	*** P < 0,001
Índice Pulmonar	1,967 ± 0,1283	2,058 ± 0,1381	NS
Índice Hepático	7.274 ± 0.3846	7.974 ± 0.5565	NS
Índice Testicular	4,430 ± 0,1134	3,273 ± 0,1687	***P < 0,001

5.2 ÁREA DE INFARTO

Após indução de 30 minutos de isquemia global e 60 minutos de reperfusão, os corações dos animais tratados com EA, durante a adolescência, apresentaram aumento de, aproximadamente, 54,76% na área de infarto (EA

¹¹ Os resultados foram expressos em média ± EPM. *P<0,05; ***P<0,001. NS, não significativo.

66,27% ± 2,75% vs CTL 45,21% ± 9,31%), em relação aos animais do grupo controle (Fig. 10).

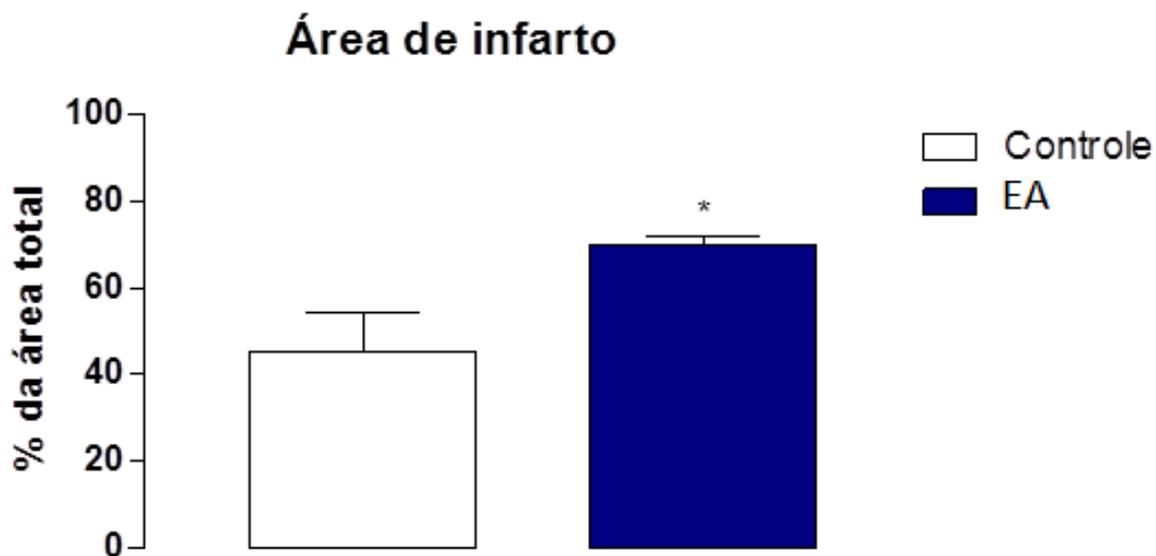


Figura 11 Área de infarto em relação à área total.¹⁰

5.3 FUNÇÃO VENTRICULAR

Junto aos efeitos morfológicos, a testosterona também afetou, significativamente, o desempenho mecânico dos corações dos ratos. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas em relação ao desempenho basal e durante a isquemia, a recuperação da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo foi significativamente menor nos corações dos animais tratados com testosterona, durante 92% do período de reperfusão cardíaca (Fig. 12).

Tendo em vista que a PDVE é, basicamente, a diferença entre a pressão sistólica e a pressão diastólica final do VE, a baixa recuperação da PDVE poderia ser decorrente tanto do aumento da PDFVE, quanto da redução na PSVE. Assim, foi observado que houve significativo aumento na PDFVE após o tratamento com EA (Fig. 13B), durante cerca de 69% do período de reperfusão

cardíaca, sem alterações relevantes na PSVE (Fig. 13A), ao longo do mesmo período.

A despeito da ausência de diferença estatística concernente à PSVE, os corações oriundos do grupo EA apresentaram redução na recuperação da dP/dt máxima, ao longo da reperfusão (Fig. 13C). Deste modo, é possível constatar que o tratamento com testosterona atenuou a velocidade de contração dos corações. Igualmente, também houve redução na dP/dt mínima, ao longo do período de reperfusão cardíaca (Fig. 13D), evidenciando a menor velocidade de relaxamento após o tratamento com testosterona. Além disso, os valores basais da velocidade de relaxamento, *per se*, também se mostraram reduzidos após o tratamento com testosterona, indicando ingerência fisiopatológica, fomentada pelo EA, sobre a função cardíaca basal, isto é, independente dos mecanismos atrelados à injúria de isquemia/reperfusão.

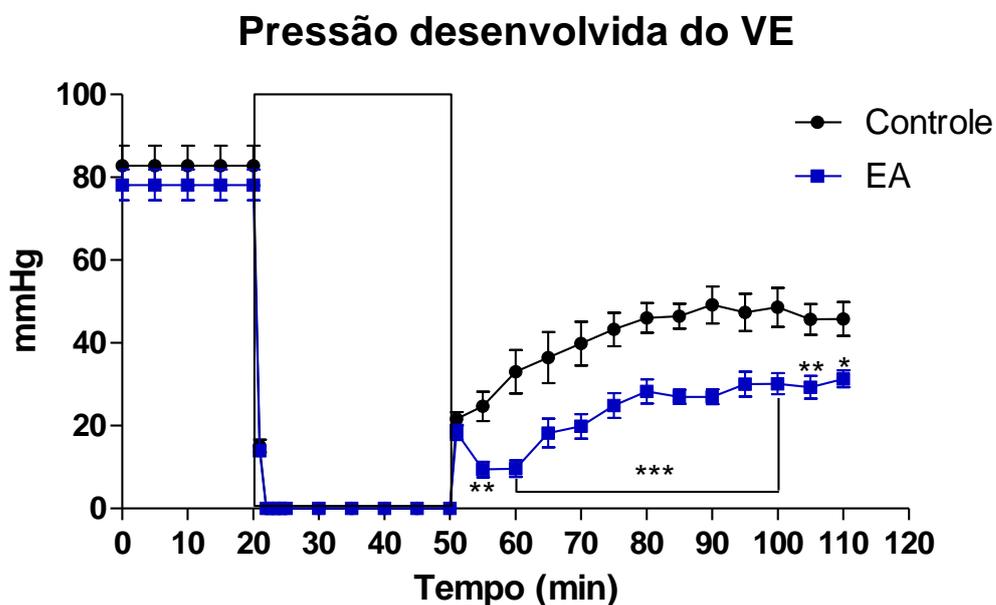


Figura 12 Pressão desenvolvida do VE.¹²

¹² Os resultados foram expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$.

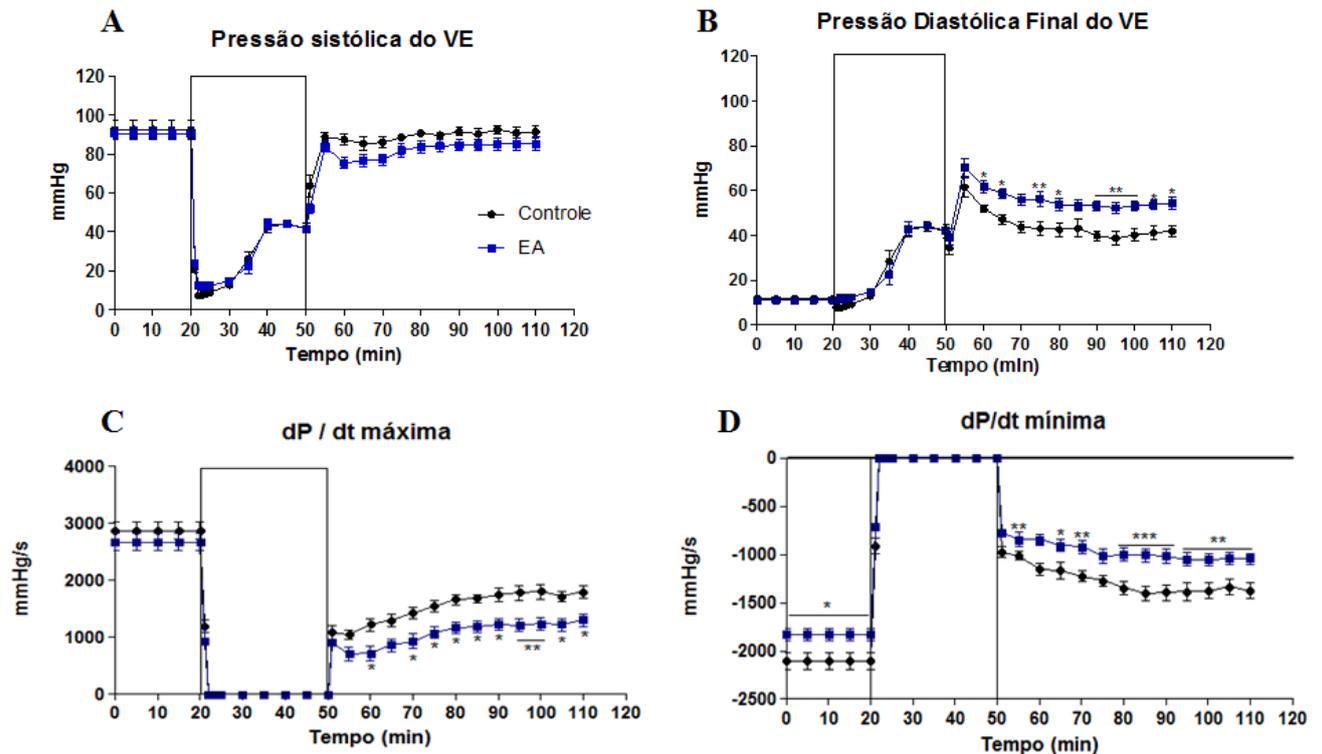


Figura 13 PSVE (A), PDFVE (B), dP/dt máxima (C) e mínima (D).¹³

5.4 ARRITMIAS CARDÍACAS

Não obstante ao remodelamento cardíaco e aos prejuízos no desempenho mecânico, os corações do grupo EA apresentaram maior pontuação em relação ao tipo de arritmias durante a fase de reperfusão. Assim, de acordo com índice de severidade de arritmias, o tratamento com testosterona, restrito a fase adolescente, favoreceu a incidência de arritmias graves, em corações isolados, oriundos de ratos *Wistar* adultos (Fig. 14).

¹³ PDVE, Pressão desenvolvida do VE; PSVE, pressão sistólica do VE; PDFVE, pressão diastólica final do VE. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001.

Índice de Severidade de Arritmias

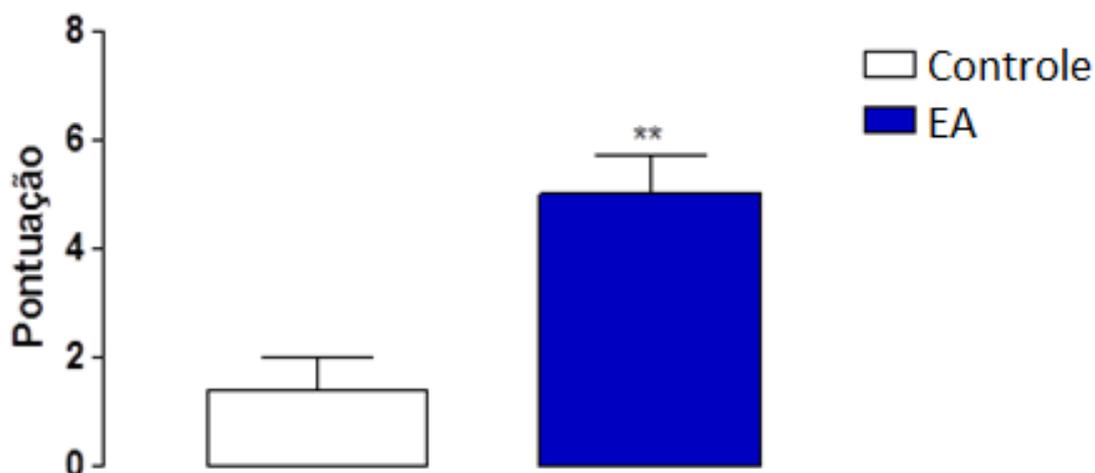


Figura 12 Susceptibilidade à ocorrência de episódios arritmicos.¹⁴

5.5 REATIVIDADE AÓRTICA

A administração de EA, ao longo da adolescência, aumenta a reatividade aórtica durante a perfusão de fenilefrina, isto é, houve maior vasoconstrição em resposta à estimulação α_1 -adrenérgica (Fig.15A) em relação ao grupo controle.

Por outro lado, os anéis de aorta oriundos do grupo EA apresentaram maior capacidade de relaxamento diante da infusão de doses crescentes de acetilcolina na solução do banho do órgão (Fig. 15B).

¹⁴ Os resultados foram expressos em média \pm EPM. **P<0,01.

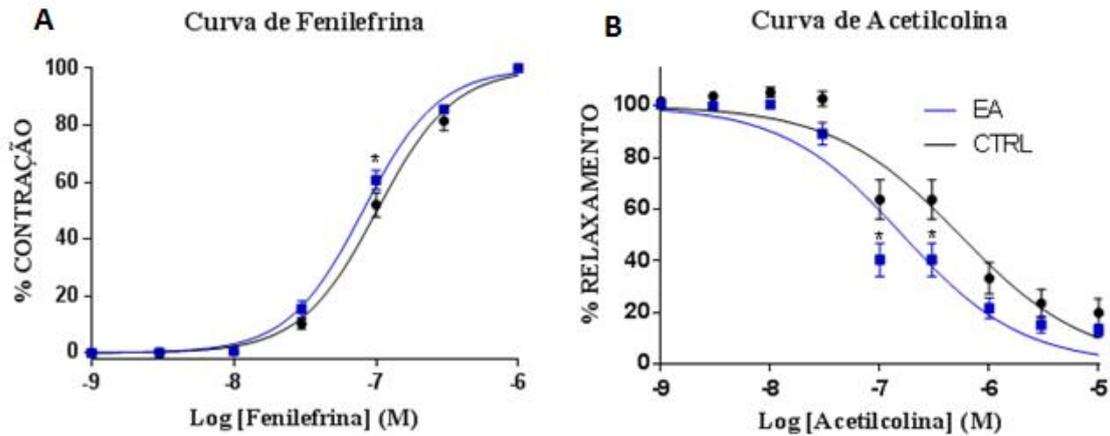


Figura 13 Reatividade aórtica.¹⁵

5.6 REXPRESSÃO DO PROGRAMA GENÉTICO FETAL

Os corações dos animais do grupo EA apresentaram maior expressão gênica da cadeia pesada de miosina tipo β (Fig.16B), em relação ao grupo controle, sem, porém, demonstrarem alteração significativa no que tange à MHC α . (Fig.16A) Por conseguinte, houve prevalência na supregulação da expressão gênica da MHC β , em relação às alterações na expressão gênica de MHC α , sendo esta razão estatisticamente maior no grupo EA, comparada ao grupo controle (Fig.16C). Em contrapartida, não foi observada diferença entre os grupos experimentais, no que tange à expressão de mRNA de BNP (Fig.16D).

Assim sendo, em concordância com a hipertrofia cardíaca e a baixa recuperação no desempenho mecânico, foi possível observar a reativação do perfil de expressão gênica fetal, comum ao longo do desenvolvimento de hipertrofia, especialmente durante a insuficiência cardíaca.

¹⁵ Os resultados foram expressos em média \pm EPM. *P<0,05.

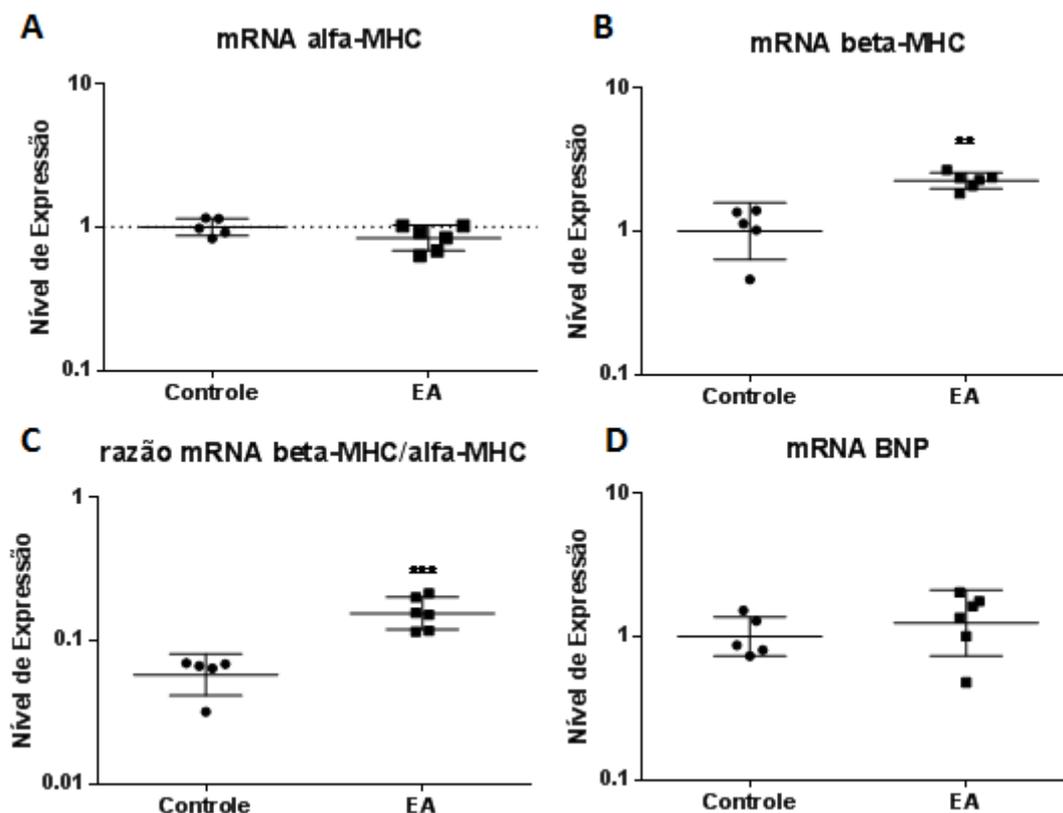


Figura 14 Reativação do programa genético fetal.¹⁶

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE SERCA2a E RyR

No intuito de se estudar os efeitos dos esteroides anabólicos sobre a expressão de proteínas relacionadas ao transporte do cálcio, foram observadas as expressões gênicas de SERCA2a e RyR entre os grupos referidos. Desta maneira, não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros supracitados. Por conseguinte, isto sugere que não há envolvimento destas proteínas nas alterações fisiopatológicas concernentes ao protocolo utilizado neste estudo.

¹⁶ MHC, cadeia pesada de miosina; BNP, peptídeo natriurético derivado do cérebro. Os resultados foram expressos em média \pm EPM, **P<0,01; ***P<0,001.

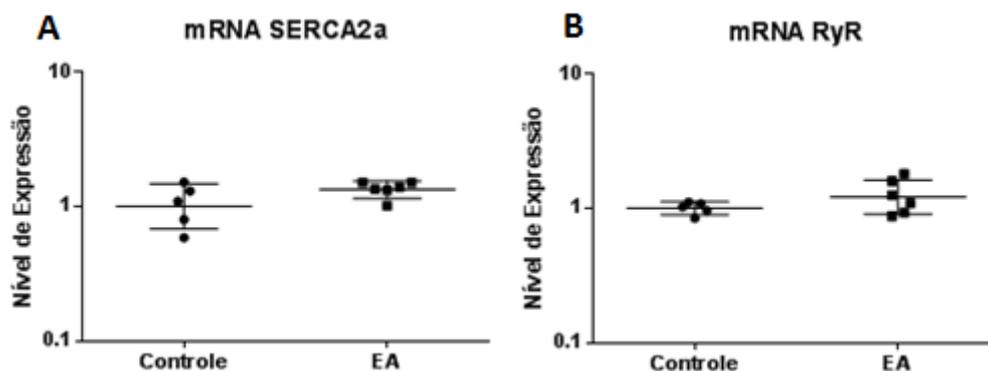


Figura 15 Expressão gênica de SERCA2a e RyR.¹⁷

5.7 ESTRESSE OXIDATIVO

A despeito da maior susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão, não foi observada nenhuma alteração no que tange à produção de peróxido de hidrogênio pelas enzimas da família Nox/Duox (Fig.18). Por conseguinte, é possível constatar que as atividades das referidas enzimas não diferiram nas condições experimentais do presente estudo.

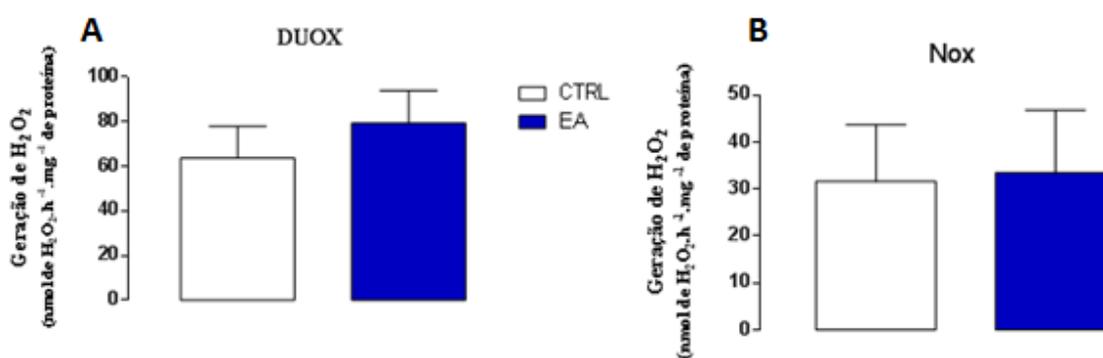


Figura 16 Atividade das enzimas DUOX e NOX.

¹⁷ DUOX, dual oxidases; Nox, NADPH oxidases; SERCA2a, ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático; RyR, receptor para rianodina. Os resultados foram expressos em média ± EPM.

Em relação à expressão gênica das enzimas referentes à maquinaria antioxidante celular, não foram observadas diferenças em relação a SOD1, SOD2, SOD3, GPx1 e GPx3 (Fig.19). No entanto, a expressão de mRNA de catalase foi, significativamente, menor no grupo EA (Fig.19F).

Conseqüentemente, a exposição aos EA, ao longo da adolescência, aumenta a susceptibilidade ao estresse oxidativo em corações de ratos *Wistar* adultos, ao longo da injúria de isquemia/reperfusão.

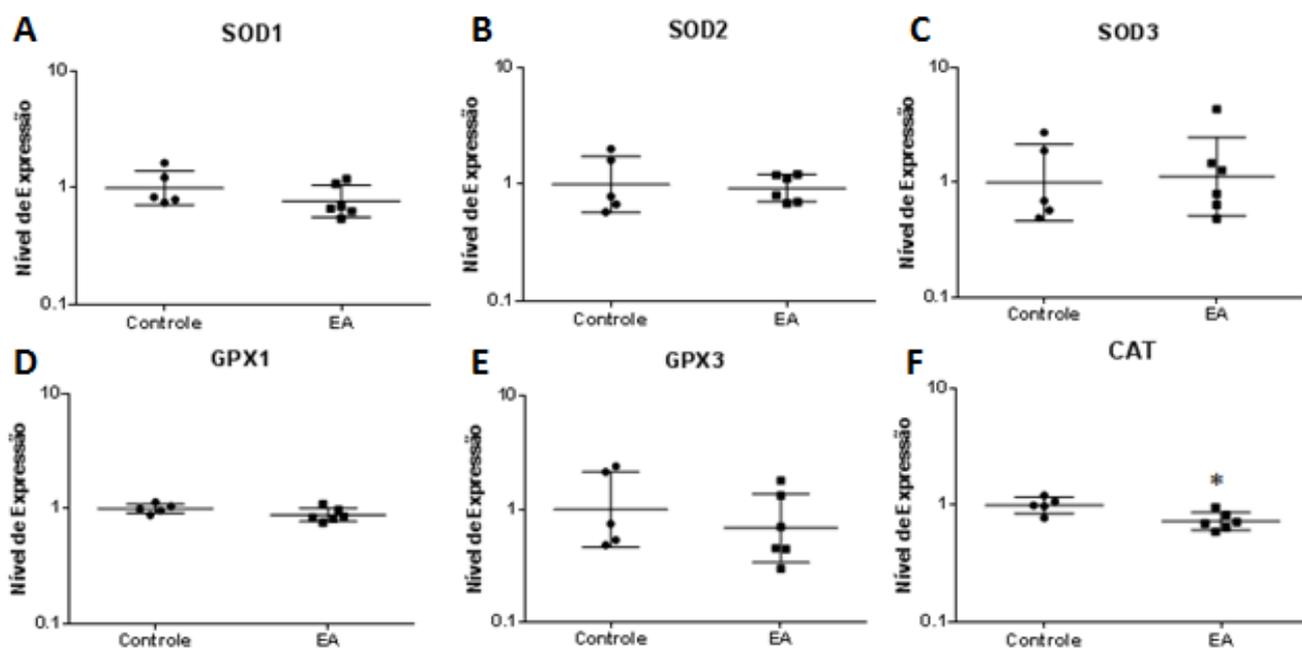


Figura 17 Expressão de mRNA das enzimas antioxidantes.¹⁸

¹⁸ SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase. Os resultados foram expressos em média ± EPM. *P<0,05.

6 DISCUSSÃO

Aparentemente, este estudo é pioneiro em avaliar os efeitos da administração crônica de EA na adolescência sobre o desdobramento da injúria de isquemia/reperfusão na fase adulta. Com base nas observações feitas neste estudo, foi possível notar, pela primeira vez:

- 1) O tratamento crônico com esteroide anabólico, durante a adolescência, promoveu hipertrofia cardíaca persistente ao longo da fase adulta.
- 2) O referido remodelamento cardíaco foi acompanhado por aumento significativo da área de infarto, após isquemia/reperfusão global.
- 3) O desempenho mecânico dos corações oriundos do grupo EA foi significativamente prejudicado durante o período basal e reperfusão. Assim, foi possível observar aumento da pressão diastólica final, em nível basal e durante a reperfusão, que, por sua vez, conduziu à redução da pressão desenvolvida pelo VE. Ademais, as velocidades de contração e relaxamento também foram, relevantemente, reduzidas, na mesma condição.
- 4) Consonante com a hipertrofia cardíaca observada, os animais do grupo EA apresentaram maior susceptibilidade à sobrecarga hemodinâmica, uma vez que a contração e o relaxamento dos anéis de aorta deste grupo, em face da perfusão de fenilefrina e acetilcolina, foram, respectivamente, maior e menor.
- 5) Corroborando o remodelamento cardíaco e o *déficit* na performance mecânica do VE, observou-se que os corações do grupo EA apresentaram reativação do perfil de expressão gênica fetal, por meio do aumento na expressão gênica de MHC β .
- 6) Em face do tratamento com testosterona, as propriedades elétricas dos corações foram, significativamente, afetadas, haja visto que foi observada maior incidência de arritmias, ao longo da reperfusão.
- 7) Não há envolvimento da expressão gênica de SERCA2a e RyR nos mecanismos fisiopatológicos atrelados à maior susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão observada, no momento observado.

7) Observou-se que a atividade das enzimas da família Nox/Duox, em corações de ratos *Wistar* adultos, não é alterada pela administração de EA ao longo da adolescência e, portanto, não interfere na injúria de isquemia/reperfusão, a despeito dos prejuízos provocados por esta abordagem farmacológica. Da mesma forma, não foi observada alteração na expressão gênica de SOD1, SOD2, SOD3, GPx1 e GPx3. Entretanto, houve menor expressão de mRNA da CAT, o que sugere maior susceptibilidade ao estresse oxidativo no grupo EA.

6.1 REMODELAMENTO CARDÍACO

A hipertrofia cardíaca (HC) é, frequentemente, referenciada como uma resposta adaptativa a diversos eventos estressores ao coração, como sobrecarga hemodinâmica, valvulopatias e infarto do miocárdio. Todavia, paradoxalmente, de acordo com o *Framingham Heart Study*, a HC pode ser considerada um forte preditor de mortalidade e morbidade na população em geral, mas especialmente em cardiopatas (Kannel *et al.* 1983). Além disso, a HC também é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, doença coronariana e acidente vascular cerebral (Kannel 1991).

Especificamente, o risco associado à HC remete tanto ao aumento da massa miocárdica, quanto à mudança na forma das câmaras ventriculares. Em virtude destas alterações, é possível observar disfunção sistólica e diastólica, maior incidência de arritmias ventriculares graves, morte súbita, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Deste modo, a HC seria uma etapa inicial, possivelmente adaptativa e clinicamente mensurável, de eventos progressivos, que conduzem à insuficiência cardíaca, constituindo o conceito de “doença cardiovascular contínua”.

Neste contexto, através da análise do peso relativo do coração, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a hipertrofia cardíaca provocada pela administração crônica de EA, ao longo da adolescência,

persiste durante a fase adulta, em ratos *Wistar*. Consonante com esta observação, estudos prévios demonstram que o tratamento crônico de ratos *Wistar* adultos com EA aumenta, significativamente, o peso relativo do coração (Chaves *et al.* 2006; Pereira-Junior *et al.* 2006; Medei *et al.* 2010; Tanno *et al.* 2011; Hassan e Kamal 2013; Marques-Neto *et al.* 2014).

Frequentemente, o remodelamento provocado pelos EA é caracterizado por hipertrofia de cardiomiócitos e apoptose celular (Zaugg *et al.* 2001; Rocha *et al.* 2007; Medei *et al.* 2010; Franquni *et al.* 2013; Hassan e Kamal 2013). Também é possível observar aumento na deposição de colágeno, supostamente em decorrência da redução na degradação desta molécula (Rocha *et al.* 2007; Franquni *et al.* 2013).

A sequência de eventos que leva ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca após administração de EA é complexa. Sabe-se que a testosterona, em nível basal, não só aumenta a expressão gênica de angiotensinogênio e renina plasmática, como também aumenta a sensibilidade cardiovascular à angiotensina II (Chen *et al.* 1992; Ojeda *et al.* 2010). Em consonância com estes eventos, a administração crônica de EA aumenta, de forma significativa, a expressão gênica e proteica do receptor para angiotensina II tipo 1 (AT1), e a expressão proteica e atividade da enzima conversora de angiotensina, tipo 1, (ECA1) nos corações de ratos *Wistar* adultos (Rocha *et al.* 2007; Franquni *et al.* 2013; Marques-Neto *et al.* 2014).

A angiotensina II (ANGII) é conhecida por engendrar hipertrofia dos cardiomiócitos e conduzir ao remodelamento cardíaco, de modo que a sua inibição promove melhoras significativas no remodelamento cardíaco pós-infarto (Pfeffer *et al.* 1992; Olivares *et al.* 2007; Trindade *et al.* 2007; Dai *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2014). Além disso, a ANGII aumenta, sobremaneira, a deposição miocárdica de colágeno, através da estimulação de receptores AT1 localizados nos fibroblastos e, indiretamente, através da via do fator transformador de crescimento 1 (TGF β 1) (Dai *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2014). Além da ANGII, Marques – Neto e colaboradores demonstraram que a exposição crônica de ratos *Wistar* adultos à sobrecarga de EA aumenta, de maneira relevante, a expressão do receptor de mineralocorticoides no coração

(Marques-Neto *et al.* 2014). Assim como a ANGII, a aldosterona é, conhecidamente, estimuladora da hipertrofia de cardiomiócitos e, principalmente, da síntese de colágeno, de modo que o antagonismo dos seus receptores é, amplamente, utilizado na rotina clínica em pacientes com insuficiência cardíaca (Silvestre *et al.* 1999; Pitt *et al.* 2003; Endemann *et al.* 2004).

Não obstante à ingerência sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a testosterona, em nível basal, também enaltece a expressão de citocinas pró-inflamatórias no coração de ratos *Wistar*, haja vista a redução na expressão de interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de crescimento tumoral α (TNF α) neste ambiente, após orquiectomia (Pavón *et al.* 2012). Em consonância com estas observações, corações oriundos de ratos *Wistar* adultos tratados cronicamente com EA mostram aumento significativo na expressão de TNF α , IL-6 e IL-1 β (Fineschi *et al.* 2011; Franqui *et al.* 2013). Concomitantemente, também é possível observar redução na expressão da IL-10, conhecida interleucina antiinflamatória, na condição supracitada (Franqui *et al.* 2013). Assim como a própria ANGII, a inflamação está relacionada, diretamente, ao processo de remodelamento cardíaco marcado por hipertrofia cardiomiocitária e fibrose e, deste modo, contribui para o fenótipo cardíaco suscitado pelos EA (Torre-Amione *et al.* 1996; Barth *et al.* 2000; Harada *et al.* 2005).

Junto à inflamação no microambiente cardíaco e à hiperatividade do SRAA, os EA também favorecem o aumento da prevalência da atividade simpática sobre a atividade parassimpática (Pereira-Junior *et al.* 2006; Hassan e Kamal 2013). Ademais, os corações de ratos *Wistar* adultos, tratados cronicamente com EA, apresentam maior expressão de receptor adrenérgico tipo β 1 e β 2 (Fineschi *et al.* 2011; Penna *et al.* 2011; Tanno *et al.* 2011). Corroborando este achado, nosso grupo também demonstrou, pela primeira vez, aumento da prevalência da atividade simpática sobre a parassimpática em ratos *Wistar* adultos, após administração crônica prévia de EA na adolescência (Olivares *et al.* 2014).

Assim sendo, haja visto que as vias β adrenérgicas, particularmente a via β 1, favorecem a hipertrofia cardiomiocitária, assim como a deposição de

colágeno, é natural excogitar a hipótese de que a hiperatividade simpática seja um mecanismo importante no desdobramento da hipertrofia cardíaca, mediante administração de EA. De fato, é possível observar que os EA acarretam lesões análogas à miocardite adrenérgica em roedores (Fanton *et al.* 2009).

Possivelmente, este característico desequilíbrio autonômico, consociado à intoxicação com EA, também envolve a redução na sensibilidade do barorreflexo (Beutel *et al.* 2005; Franquni *et al.* 2013). Diante deste contexto, Marques – Neto e colaboradores demonstraram que o bloqueio do SRAA, ao longo do tratamento crônico com EA na fase adulta, reverte o referido desequilíbrio autonômico supracitado (Marques Neto *et al.* 2013). Portanto, é criticamente sugestivo que a sobrecarga crônica de EA promova uma ingerência fisiopatológica ao nível da liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas cardíacas, ou mesmo no SRAA central, em adição ao aumento na expressão dos receptores beta-adrenérgicos ao nível cardíaco.

6.2 REATIVIDADE DA AORTA

O impacto do aumento da pressão arterial no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca já foi evidenciado tanto ao nível experimental, quanto clínico. Estudos mostram que há uma correlação diretamente proporcional entre a espessura da parede ventricular esquerda e os níveis pressóricos, monitorados ao longo de 24 horas, em humanos (Verdecchia *et al.* 1990). Ademais, no *Framingham Heart Study*, foi possível observar relação causa-efeito entre variações na pressão sistólica e a labilidade na massa miocárdica, em cerca de 10% dos pacientes, ao longo de 30 anos (Kannel *et al.* 1983).

Assim, com o espessamento da parede ventricular, o estresse de parede exercido pela sobrecarga pressórica é, supostamente, reduzido, de acordo com a lei de Laplace. Por conseguinte, esta relação sugere, novamente, que a hipertrofia cardíaca consiste em um mecanismo adaptativo em face da sobrecarga pressórica. No entanto, conforme a hipertrofia se desenvolve, a capacidade contrátil intrínseca é, paulatinamente, atenuada. Além disso, como

mencionado no tópico anterior, a hipertrofia cardíaca consiste no fator de risco mais importante para o desenvolvimento de diversas cardiopatias.

Dentro deste contexto, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que o tratamento de ratos *Wistar* adolescente com EA alterou a reatividade da aorta, em relação ao grupo controle, na fase adulta. Fundamentalmente, os anéis de aorta dos animais do grupo EA apresentaram maior contração mediante administração de fenilefrina, conhecido agonista α_1 -adrenérgico. Por outro lado, a capacidade de relaxamento dos anéis de aorta, provocada pela acetilcolina, foi aumentada no grupo EA, em comparação ao grupo controle. Em suma, isto indica que os anéis de aorta do grupo EA apresentaram maior reatividade em face a estímulos vasoconstritores e vasodilatadores. Somada à maior atividade simpática, observada nas mesmas condições experimentais, é possível excogitar a hipótese de que a maior reatividade vascular à estímulos vasoconstritores conduza os animais do grupo EA à sobrecarga hemodinâmica.

Corroborando o presente estudo, a sobrecarga crônica de EA, restrita a fase adulta de ratos *Sprague-Dawley*, promove aumento da vasoconstrição sensível à fenilefrina, concomitantemente à redução na vasodilatação sensível ao óxido nítrico, em anéis de aorta isolados, na presença de endotélio (Ferrer *et al.* 1994). Estas alterações são ilustradas, *in vivo*, pelo aumento significativo da pressão arterial sistólica, em ratos *Wistar*, após administração crônica de EA (Tanno *et al.* 2011). Especificamente, Hassan e colaboradores demonstraram aumento da pressão arterial sistólica a partir da 4^a semana de sobrecarga com EA, em ratos *Wistar* adultos (Hassan e Kamal 2013).

Condizente com as observações experimentais, consumidores de EA demonstram maior pressão sistólica, diastólica e pulsátil, em relação aos pacientes-controle (Kasikcioglu *et al.* 2007). Além disso, a capacidade vasodilatadora, induzida por glicerol trinitrato, também é prejudicada nesta condição (Lane *et al.* 2006). Deste modo, este referido cenário pressórico reflete, supostamente, o aumento da rigidez aórtica, em usuários de EA (Kasikcioglu *et al.* 2007).

Ainda que os experimentos do presente estudo tenham sido conduzidos somente na presença do endotélio, não é possível constatar se as disfunções

vasculares observadas remetem, exclusivamente, a esta camada vascular. Em face do caráter lipofílico dos EA, a atuação destas moléculas no leito vascular pode ocorrer ao nível endotelial e/ou da musculatura lisa.

Em contraste com as nossas observações, diversos estudos demonstram, experimentalmente, que a testosterona, em nível fisiológico, reduz a reatividade vascular agudamente e cujo mecanismo envolvido neste evento varia entre os leitos vasculares. Além disso, Franquni e colaboradores não observaram alterações relacionadas à reatividade de anéis da aorta, após administração crônica de EA em ratos *Wistar* adultos (Franquni *et al.* 2013).

Em anéis de aorta torácica, a testosterona promove vasodilatação associada ao endotélio, porém, não dependente do mesmo, possivelmente através do estímulo da secreção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase, de maneira não genômica (Costarella *et al.* 1996). Além disso, o antagonismo de canais para cálcio tipo L dependentes de voltagem (LTCC), presentes em miócitos vasculares, é particularmente importante para o relaxamento da musculatura lisa em anéis de aorta torácica pela testosterona (Montaño *et al.* 2008). Contudo, observou-se efeito dual nesta condição, visto que, enquanto doses na escala nanomolar provocaram inibição dos LTCC, concentrações na escala micromolar aumentaram a corrente de cálcio no miócito vascular, o que, por sua vez, favorece a contração deste fenótipo celular e, assim, vasoconstrição (Montaño *et al.* 2008). Por outro lado, no leito vascular mesentérico, a vasodilatação promovida pela testosterona envolve, possivelmente, a síntese de óxido nítrico endotelial e, subsequentemente, a ativação de canais para potássio ativados por cálcio, de maneira não genômica (Tep-Areenan *et al.* 2002).

Em contrapartida, estudos prévios mostram que a orquiectomia reduz o tônus vascular das artérias cerebrais médias, somente na presença de endotélio, e, supostamente, através do aumento síntese de tromboxano A2 e ácido hidroecotetranóico (Gonzales *et al.* 2004; Gonzales *et al.* 2005; Vasudevan *et al.* 2012). Em longo prazo, portanto, é possível observar redução na pressão arterial, em ratos *Wistar* espontaneamente hipertensos, após submissão à orquiectomia (Morano *et al.* 1990).

Adicionalmente, a testosterona também favorece a elevação na síntese de espécies reativas de oxigênio nos leitos vasculares. Em parte, este referido efeito depende do aumento na expressão de Nox e da migração de células da musculatura lisa, o que, conseqüentemente, favorece o remodelamento vascular em ratos *Wistar*, espontaneamente hipertensos ou não, no período de 30 – 120 minutos pós-administração de testosterona (Chignalia *et al.* 2012). Condizente com estas observações experimentais, a vasodilatação mediada pelo endotélio, em resposta à hiperemia, é significativamente maior em homens com hipogonadismo, em comparação com pacientes-controle, sendo este padrão revertido após tratamento crônico com testosterona (Zitzmann *et al.* 2002).

Desta maneira, sugere-se que, cronicamente, a testosterona promova alterações estruturais e funcionais no microambiente vascular que, por sua vez, favorecem maior reatividade arterial a estímulos vasoconstritores, como observado no presente estudo, o que condiz com a sobrecarga pressórica observada *in vivo* em outros estudos. Além disso, os já mencionados aumentos na atividade do SRAA e da vertente simpática do sistema nervoso autônomo também contribuem para o aumento da resistência vascular periférica e, assim, da pós-carga, após administração de EA.

Assim, é possível que a maior sobrecarga hemodinâmica corrobore o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e, assim, contribua para o aumento da susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão cardíaca, em ratos *Wistar* adultos.

6.3 AUMENTO NA ÁREA DE INFARTO

Associado à hipertrofia cardíaca, a média da área de infarto dos corações do grupo EA foi, aproximadamente, 54,76% maior que a média do grupo controle. Ratificando esta observação, Penna e colaboradores também

observaram maior susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão, através da área de infarto, após administração crônica de decanoato de nandrolona restrita à fase adulta (Penna *et al.* 2011).

Em contraste, estudos prévios não observaram aumento da área de infarto após exposição crônica a EA (Chaves *et al.* 2006; Marques Neto *et al.* 2013). Primeiramente, esta diferença põe em evidência as diferentes características farmacocinéticas atreladas ao decanoato de nandrolona, utilizado no referido trabalho, e ao propionato de testosterona, utilizado no presente estudo.

A 19-nortestosterona, também conhecida como nandrolona, apresenta um arcabouço molecular similar à testosterona, sem o grupo 19-metil, que dá origem à 17-decanoato-19-nortestosterona (Decanoato de Nandrolona, DECA). Esta esterificação confere uma taxa de absorção mais lenta e, portanto, aumenta sua meia-vida após administração intramuscular (Minto *et al.* 1997). Assim como no presente estudo, a DECA é solubilizada em veículo oleoso (óleo de amendoim e álcool benzílico) e administrada via intramuscular, assim, não sofre metabolismo de primeira passagem hepática (Minto *et al.* 1997). No entanto, sua esterificação é prontamente desfeita pela ação de esterases plasmáticas, originando a 19-nortestosterona.

Nos tecidos que expressam a enzima 5 α -redutase, a 19-nortestosterona é convertida em 5 α -dihidro-19-nortestosterona, cuja afinidade pelo receptor para andrógenos é, aproximadamente, 10 vezes menor do que a DHT (Tóth e Zakár 1982). Além disso, sua aromatização é 80% menos eficaz em comparação à molécula da testosterona, o que se reflete em menores efeitos estrogênicos (Ryan 1959). Neste contexto, embora as células presentes no coração não expressem a 5 α -redutase (Normington e Russell 1992), a aromatase é, por sua vez, amplamente expressa (Grohé *et al.* 1997).

Desta maneira, é provável que a ingerência estrogênica, no presente estudo, seja, aparentemente, superior, tanto no microambiente cardíaco, quanto nos demais tecidos positivos para a expressão de aromatase, em comparação com o estudo conduzido por Chaves e colaboradores. Por outro lado, tecidos que apresentam expressão da enzima 5 α -redutase são,

supostamente, mais reativos ao tratamento desempenhado no presente estudo, haja visto que, como fora mencionado, o produto da catálise desempenhada por esta enzima, sobre a testosterona, é a DHT, cuja potência é, significativamente, superior à 5 α -dihidro-19-nortestosterona.

Esta diferença também sugere que o consumo de EA na adolescência provoca mudanças críticas no microambiente cardíaco, de modo que a sobrevivência dos cardiomiócitos, perante o episódio de isquemia e, subsequentemente, reperfusão cardíaca, é, criticamente, mais afetada, em relação ao tratamento restrito à fase adulta.

Adicionalmente, a notável diferença na área de infarto pode ser decorrente da própria hipertrofia precedente. Em sua essência, corações hipertrofiados demonstram menor resiliência perante a injúria de isquemia/reperfusão, tanto em modelos *in vivo*, quanto *ex vivo*. A rarefação da microcirculação coronariana e redução da reserva coronariana, observadas em diversos modelos de hipertrofia cardíaca, parecem ser fatores providenciais para aumentar a susceptibilidade dos corações hipertróficos à injúria de isquemia/reperfusão (Levy *et al.* 2001); (Brilla *et al.* 1991). Além disso, a fibrose intersticial, assim como os focos inflamatórios presentes no miocárdio hipertrófico, sobretudo nas áreas perivasculares, podem diminuir, dramaticamente, o fluxo de oxigênio e nutrientes para os cardiomiócitos, tanto no período pré-isquêmico, quanto na reperfusão (Brilla *et al.* 1991). Por conseguinte, junto à elevada demanda energética inerente aos cardiomiócitos hipertróficos, os eventos supracitados aumentam, sobremaneira, a susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão.

Não obstante à sugestiva ingerência fisiopatológica atrelada à hipertrofia cardíaca, diversos estudos sugerem que a testosterona, em nível fisiológico, contribui, diretamente, nos eventos celulares que culminam com a formação do infarto. De fato, experimentalmente, machos desenvolvem área de infarto significativamente superior às fêmeas (Bae e Zhang 2005; Brown *et al.* 2005; Lagranha *et al.* 2010).

Particularmente, a testosterona, em nível basal, favorece o aumento na atividade da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) (Wang *et al.*

2005). Embora os mecanismos envolvidos na ativação da p38MAPK pela testosterona não estejam totalmente claros, sabe-se que esta enzima exerce um papel chave na ativação de vias pró-apoptóticas ao longo da injúria de isquemia/reperfusão (Ma *et al.* 1999). Aparentemente, a via pró-apoptótica atrelada à p38MAPK envolve, em parte, a inibição das cinases reguladas por sinalização extracelular e, conseqüentemente, o silenciamento parcial do Sinal de transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3) (Porras *et al.* 2004). De fato, a orquiectomia atenua, de maneira significativa, a ativação de STAT3 e do Supressor de sinalização de citocina 3, mediante isquemia e reperfusão *ex vivo* (Wang *et al.* 2009).

Presumivelmente, em face da hiperativação da p38MAPK e concomitante silenciamento da STAT3, a proteína pró-apoptótica mitocondrial Bax acaba sendo regulada positivamente (Porras *et al.* 2004). De fato, a testosterona, em níveis fisiológicos e supra-fisiológicos, aumenta, sobremaneira, a razão da expressão proteica de Bax/Bcl-2 (Zaugg *et al.* 2001; Huang *et al.* 2010). Conseqüentemente, isto conduz à formação do PTM, liberação do citocromo c e, assim, ativação da via das caspases, conseqüentemente provocando a apoptose celular (Narita *et al.* 1998; Borutaite *et al.* 2003; Hassan e Kamal 2013). Condizente com esta observação, a orquiectomia, assim como o tratamento com antagonistas do receptor para andrógenos, atenua a ativação das caspases 1 e 11, após a indução da injúria de isquemia/reperfusão em corações isolados (Wang *et al.* 2005).

Não obstante à indução de vias pró-apoptóticas, a testosterona também induz a inibição de vias antiapoptóticas. Particularmente, tanto a testosterona, quanto a DHT regulam, negativamente, a ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e, por conseguinte, a ativação da proteína cinase B (PKB / Akt) (Huang *et al.* 2010). Essencialmente, a Akt exerce um papel fundamental na manutenção da integridade cardiomiocitária, em face de diversas condições estressoras no coração, como o próprio infarto do miocárdio e hipertrofia cardíaca. Assim, através da inibição da via PI3K/Akt, a biodisponibilidade do fator de transcrição FOXO3a aumenta, assim como a expressão dos seus alvos, como o receptor CD95L, também conhecido como FasL, da família de receptores de TNF- α , conhecido por promover apoptose (Huang *et al.* 2010).

Outrossim, é possível que o aumento na expressão de FasL pela testosterona também envolva a via da p38MAPK (Sharov *et al.* 2003). Por conseguinte, em face do aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no microambiente cardíaco, promovida pela testosterona diante da injúria de isquemia/reperfusão, o aumento na expressão de FasL torna-se, potencialmente, importante no desenvolvimento da área de infarto.

Apesar das observações supracitadas, poucos estudos se dispuseram a estudar a vias de sinalização atreladas ao aumento da área de infarto em decorrência da sobrecarga de EA, na referida condição. Dentro deste contexto, o estudo conduzido por Marques-Neto e colaboradores destaca a redução na expressão dos canais para potássio sensíveis à ATP (Katp), após administração crônica de EA na fase adulta (Marques Neto *et al.* 2013).

A priori, o canal Katp atua como um sensor metabólico e, portanto, mediante redução da razão na biodisponibilidade intracelular de ATP / ADP, o poro do canal é aberto e favorece o efluxo de potássio. Como corolário deste evento, o potencial de ação sarcolemar é, significativamente, reduzido, o que, presumivelmente, reduz a sobrecarga sarcoplásmica de cálcio durante a isquemia (Suzuki *et al.* 2003). Isto decorre do fato de que em potenciais de membrana mais negativos, a atividade dos canais para cálcio tipo L voltagem-dependentes é menor. Conseqüentemente, a reduzida expressão destes canais, após administração crônica de EA, atenua a resiliência em face da injúria de isquemia/reperfusão, comprovada através do modelo *ex vivo* em aparato de Langendorff (Marques – Neto *et al.*, 2013). No entanto, ainda são necessários muitos esforços no intuito de se caracterizar, precisamente, as vias de sinalização moduladas pelos EA que estão envolvidas no desdobramento do infarto do miocárdio.

6.4. COMPROMETIMENTO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS CARDÍACAS

Tendo em vista que a administração de EA, ao longo da adolescência, provocou aumento da massa cardíaca e da área de infarto, é presumível que as propriedades mecânicas também sejam prejudicadas. Deveras, a recuperação da pressão desenvolvida pelo VE foi, significativamente, reduzida no grupo EA. Essencialmente, a pressão desenvolvida consiste na diferença entre as pressões sistólica e diastólica, ou seja, a redução na PDVE pode decorrer tanto da redução na pressão sistólica, quanto do aumento na pressão diastólica. Assim, foi observado que, nas condições desenvolvidas neste estudo, os animais do grupo EA apresentaram aumento significativo da pressão diastólica final, em comparação ao grupo controle, sem alterações relevantes concernentes à pressão sistólica, durante a reperfusão.

A despeito da ausência de alterações em relação à pressão sistólica, a recuperação da velocidade de contração, mensurada através da primeira derivada de pressão máxima, foi, significativamente, menor após o tratamento com testosterona, ao longo da reperfusão. De maneira similar, a recuperação da dP/dt mínima foi, significativamente, atenuada nos corações dos ratos do grupo EA. Além disso, a própria dP/dt mínima basal mostrou-se atenuada no grupo EA. Diversas evidências clínicas sugerem que disfunções diastólicas, amiúde, precedem a hipertrofia cardíaca clinicamente detectável. Além disso, a própria redução da propriedade luzitrópica do coração aumenta, por si, a morbimortalidade cardiovascular. Portanto, é possível que a hipertrofia cardíaca observada neste estudo seja o corolário, dentre outros fatores de risco, da redução na função diastólica do coração, constituindo, assim, diferentes fases da doença cardiovascular contínua. Em contraste com as nossas observações, a administração crônica de EA, *per se*, ao longo da fase adulta, não foi capaz de afetar os parâmetros supracitados, significativamente, em diversos estudos (Chaves *et al.* 2006; Penna *et al.* 2011; Marques Neto *et al.* 2013).

Efetivamente, nenhuma relação causa-efeito foi demonstrada no intuito de se elucidar mecanismos atrelados ao déficit nas propriedades mecânicas do coração no grupo EA. Neste contexto, a hipertrofia cardíaca é um dos principais riscos à função mecânica do coração, independente do possível viés adaptativo. Como já foi mencionado anteriormente, dentre as características

inerentes ao remodelamento cardíaco provocado pelos EA, destaca-se o aumento na deposição de colágeno e hipertrofia concêntrica (Rocha *et al.* 2007; Franquni *et al.* 2013). Além disso, a testosterona, em nível basal, confere maior desorganização na disposição das fibras musculares cardíacas (Pavón *et al.* 2012). À vista das alterações supracitadas, as propriedades viscoelásticas do coração são, significativamente, prejudicadas, de modo que a pressão diastólica é, primariamente, elevada e, assim, o enchimento ventricular é comprometido. Subsequentemente, isto favorece a redução no débito sistólico, assim como no débito cardíaco. Em contrapartida, outros estudos também observaram hipertrofia cardíaca sem, contudo, estar associada à disfunção mecânica, após administração crônica de EA (Chaves *et al.* 2006; Marques-Neto *et al.* 2014). Deste modo, é possível que o remodelamento cardíaco evocado pelos EA seja importante, porém, não seja o único fator necessário para a depreciação da função mecânica cardíaca.

Em conjunto com a mudança no fenótipo cardíaco, as alterações no metabolismo e no arcabouço celular cardiomiocitário também contribuem para o comprometimento da função mecânica cardíaca, neste contexto. Particularmente, a testosterona, em nível basal, estimula o metabolismo glicolítico, em cardiomiócitos, através do aumento na expressão de GLUT, via cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico e da cinase dependente de cálcio-calmodulina (Wilson *et al.* 2013). Assim é possível observar aumento na produção de energia. Por outro lado, em doses supra-fisiológicas, é possível observar lesões mitocondriais e sarcoméricas no miocárdio, o que sugere alterações nocivas no metabolismo energético e na capacidade de encurtamento do sarcômero, em cardiomiócitos de roedores, após administração crônica de EA na fase adulta (Appell *et al.* 1983). Deste modo, são necessários mais estudos para caracterizar os eventos bioquímicos atrelados ao metabolismo energético cardiomiocitário, em modelos de sobrecarga de esteroides anabólicos e, assim, concatenar novos horizontes em relação às disfunções cardíacas atreladas a este modelo.

A priori, a própria área de infarto também contribui, de maneira proeminente, na redução da performance contrátil do coração. Neste contexto, observa-se uma estreita correlação negativa entre o tamanho da área de infarto

e a PDVE, provavelmente devido ao aumento da pressão diastólica final (Pfeffer *et al.* 1992). Esta correlação é vista, principalmente, em áreas de infarto acima de 47% da área total do VE, mas também pode ser notada em áreas de infarto moderadas (31 – 46%) (Pfeffer *et al.* 1992).

Os mecanismos associados à perda da capacidade contrátil, em função da área de infarto, remetem desde a perda de substrato contrátil, *per se*, isto é, a morte de cardiomiócitos, até o desenvolvimento de resposta inflamatória no miocárdio preservado. Diversas moléculas pró-inflamatórias favorecem o comprometimento do encurtamento de fibras cardiomiocitárias, em parte, devido à estimulação da cinase regulada por sinalização apoptótica (ASK), via espécies reativas de oxigênio. Assim, ASK fosforila a troponina T, o que provoca a dessensibilização da maquinaria sarcomérica (Woldbaek *et al.* 2003).

No entanto, da mesma forma que a hipertrofia cardíaca, estudos precedentes mostram que, a despeito do aumento na área de infarto provocado pelos EA, o desempenho contrátil do VE não é, significativamente, afetado (Penna *et al.* 2011). Novamente, estas divergências enaltecem a influência das diferentes propriedades farmacocinéticas entre os fármacos utilizados neste, e nos demais estudos. Como a testosterona é convertida em DHT, enquanto a nandrolona é convertida em metabólitos menos ativos, é provável que os efeitos provocados pela testosterona sejam mais agressivos.

Além disso, a relação idade – tratamento fica, novamente, em evidência, diante das divergências com os estudos conduzidos somente ao longo da fase adulta. Supostamente, é possível que a administração de EA durante a adolescência seja, proeminentemente, mais capciosa à integridade funcional do sistema cardiovascular, ao longo da fase adulta, após desdobramento da injúria de isquemia/reperfusão, já que as propriedades mecânicas foram, de maneiral geral, mais afetadas do que em estudos conduzidos em adultos.

6.5 REPROGRAMAÇÃO GÊNICA FETAL

Junto ao desenvolvimento de hipertrofia descompensada, o coração também sofre um processo de reprogramação gênica fetal, em face de estímulos estressores. Frequentemente, este processo é caracterizado por aumento na maquinaria enzimática atrelada ao metabolismo glicolítico, redução da maquinaria enzimática associada ao metabolismo lipídico, aumento da expressão dos peptídeos natriuréticos, atrial e cerebral (BNP) (Razeghi *et al.* 2001). Além disso, diante do *déficit* no desempenho mecânico observado em diversos modelos de hipertrofia cardíaca, especialmente redução na tensão ativa e na velocidade de encurtamento fibrilar, propôs-se a correlação destas alterações com a atividade ATPásica da miosina, localizada nas cadeias pesadas deste molécula (MHC).

Originalmente, a molécula da miosina é composta por um par de MHC e dois pares de cadeias leves. No coração, é possível observar três padrões diferentes em relação à expressão das MHC, V1, V2 e V3, que diferem em relação à combinação das isoenzimas α e β . Em sua essência, V1 consiste na expressão do padrão $\alpha\alpha$, V2, em $\alpha\beta$, enquanto V3 refere-se à expressão do padrão $\beta\beta$. Em seres humanos, a composição das MHC no miocárdio ventricular apresenta prevalência da isoforma β (Miyata *et al.* 2000). Em contrapartida, em roedores, a isoforma α prevalece (Izumo *et al.* 1987).

A despeito destes padrões pré-estipulados, diversos estímulos pró-hipertrofos, endógenos e exógenos, são capazes de alterar a expressão das isoformas α e β . Em geral, o hipertireoidismo, o exercício, a gestação, frequentemente consociados ao padrão de hipertrofia, frequentemente denominada na literatura como fisiológica, aumentam a expressão gênica e proteica de MHC α , em roedores (Izumo *et al.* 1987). Isto, então, confere maior velocidade na atividade ATPásica da miosina o que, por sua vez, favorece o aumento na velocidade e força de encurtamento dos cardiomiócitos.

Em contrapartida, a MHC β , prevalente somente na fase fetal da vida em roedores, confere maior economia energética na geração de força, visto que a integral tensão-tempo para força por ciclo de ponte cruzada é superior. Apesar desta virtude, diversos modelos de “hipertrofia patológica” são caracterizados pelo aumento na expressão gênica e proteica da isoforma β , associado à

redução na expressão da isoforma α , concomitantemente à queda no desempenho contrátil (Izumo *et al.* 1987; Ueta *et al.* 2012).

No presente estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, que a sobrecarga de EA favorece, condizente com a hipertrofia cardíaca patológica, o desenvolvimento da reprogramação gênica fetal, haja vista a prevalência na alteração da expressão gênica de MHC β sobre MHC α , observada nos corações do grupo EA. De fato, esta referida mudança na programação gênica corrobora as disfunções mecânicas observadas no presente estudo, em especial a redução na dP/dt máxima.

Os mecanismos condizentes com a reativação gênica fetal, após sobrecarga de EA, ainda não foram descritos. Contudo, diversos estudos relatam que a orquiectomia aumenta a razão da expressão gênica de MHC β /MHC α em cardiomiócitos, em contrapartida à redução neste parâmetro mediante reposição da testosterona, sendo os dois padrões dependentes da redução e aumento, respectivamente, na expressão gênica de MHC α e MHC β (Gustafson *et al.* 1987; Morano *et al.* 1990; Calovini *et al.* 1995; Golden *et al.* 2004).

Em contraste, não foi observada alteração no padrão de expressão gênica da MHC α no presente estudo. Por conseguinte, sugere-se que o estabelecimento da prevalência na alteração da expressão de MHC β em corações de ratos *Wistar* adultos, no nosso modelo, não remete ao efeito direto da ativação dos receptores androgênicos, mas sim aos demais estímulos pró-hipertroficantes iniciados pelos EA, como a hiperatividade do SRAA (Okoshi *et al.* 2004).

Em contrapartida às observações em relação à MHC, não foi observada alteração na expressão gênica de BNP entre os grupos experimentais. Notavelmente, a expressão gênica de BNP é, frequentemente, aumentada em corações hipertroficantes, especificamente em casos de hipertrofia descompensada, ao nível clínico e experimental (Luchner *et al.* 2000; Francis *et al.* 2001). Por outro lado, a transição da hipertrofia descompensada para a compensada é caracterizada pela normalização da expressão do mRNA de BNP cardíaco. Por conseguinte, é provável que a hipertrofia cardíaca

observada neste modelo não seja tão agressiva a ponto de alterar a expressão gênica de BNP, ou mesmo que já esteja sendo revertida.

6.6 COMPROMENTIMENTO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS CARDÍACAS

Uma das principais causas de óbito, durante a reperfusão cardíaca, é o desenvolvimento de episódios arrítmicos que, por sua vez, favorecem a ocorrência de assitolia e morte súbita. Desta maneira, qualquer evento que, porventura, aumente a incidência de episódios arrítmicos, na condição supracitada, confere riscos proeminentes à higidez do paciente. Clinicamente, as arritmias mais graves envolvem perturbações nas propriedades elétricas ventriculares, de modo a afetar, criticamente, o débito cardíaco, como taquicardia / *flutter* ventricular e fibrilação ventricular.

Neste contexto, de acordo com índice de severidade de arritmias, observou-se que a sobrecarga crônica de EA em ratos Wistar machos, ao longo da adolescência, favorece, relevantemente, a incidência de arritmias graves, durante a reperfusão cardíaca, em corações isolados, ao longo da fase adulta. Aparentemente, esta é a primeira vez em que o consumo de EA é concatenado à maior incidência de episódios arrítmicos, ao longo da injúria de isquemia/reperfusão.

De maneira geral, a hipertrofia cardíaca, *per se*, favorece o desdobramento de perturbações eletrofisiológicas miocárdicas e, assim, de episódios arrítmicos fatais (Levy *et al.* 1987). A princípio, estas perturbações são sustentadas por alterações morfológicas, como a maior deposição de colágeno na matriz extracelular e a hipertrofia dos cardiomiócitos. O colágeno atua como um isolante elétrico no microambiente cardíaco e, assim, provoca o desacoplamento elétrico dos cardiomiócitos, fazendo com que o coração deixe de funcionar como um sincício (Saba *et al.* 2005; Almaas *et al.* 2013). A hipertrofia de cardiomiócitos, por sua vez, aumenta a dispersão do impulso elétrico, observando-se prolongamento do intervalo QT, além de aumento na

amplitude do complexo QRS, sendo ambos preditores de mortalidade (Oikarinen *et al.* 2004).

Ademais, a ingerência fisiopatológica peculiar dos EA sobre as propriedades elétricas do sarcolema configura um risco a parte concernente ao desenvolvimento de arritmias. Fundamentalmente, a testosterona, *per se*, favorece o aumento da corrente pelo LTCC, através dos receptores nucleares, e inibição da mesma corrente, agudamente, de maneira não-genômica (Er *et al.* 2007). Além disso, a exposição crônica de ratos *Wistar* a doses supra-fisiológicas de EA reduz, sobremaneira, a expressão de subunidades do canal para a corrente de potássio Ito (Kv1.4; Kv4.3; KChIP2), de modo que é possível observar prolongamento do potencial de ação, mensurado em 90% de duração e, conseqüentemente, maior duração do intervalo QT, em cardiomiócitos (Medei *et al.* 2010). Conseqüentemente, os riscos de ocorrência de pós-despolarizações precoces, assim como de *Torsades de pointes* e fibrilação ventricular são, significativamente, elevados.

Outros possíveis mecanismos arritmogênicos presentes nas síndromes cardiovasculares provocadas pelos EA envolvem, essencialmente, o aumento da atividade do SRAA, da inflamação no microambiente cardíaco e, principalmente, o aumento da atividade simpática, sendo possível observar, aumento da frequência cardíaca basal em ratos *Wistar* adultos, após tratamento crônico com EA (Hassan e Kamal 2013). Presumivelmente, a maior área de infarto encontrada nos corações dos ratos do grupo EA também favorece aumento na incidência de arritmias graves. Essencialmente, devido à maior perda de cardiomiócitos no grupo EA, a condução elétrica através do miocárdio é, supostamente, mais afetada pelas alterações elétricas sarcolemas, além do reconhecido desacoplamento das junções *gap* no miocárdio isquêmico.

6.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CÁLCIO

Fisiologicamente, o cálcio é fundamental para a contração cardíaca, através da interação com a troponina C, o que permite o acoplamento entre actina e miosina. No entanto, ao longo da injúria de isquemia/reperfusão, a sobrecarga deste íon favorece diversas alterações perniciosas às propriedades elétricas e contráteis do cardiomiócito, além de iniciar cascatas de sinalização pró-apoptóticas. Desta forma, levando em consideração a reduzida dP/dt mínima basal no grupo EA, além do déficit na recuperação do desempenho mecânico e da maior incidência de arritmias cardíacas no grupo EA, é possível que os EA interajam com a maquinaria celular atrelada ao balanço do cálcio.

Fundamentalmente, em níveis basais, a testosterona modula, positivamente, a força de contração dos cardiomiócitos, através da inibição da fosfolambam e, assim, maior ativação da SERCA2a (Witayavanitkul *et al.* 2013). Por outro lado, a sensibilidade do receptor para rianodina (RyR) ao cálcio é elevada em ratos orquiectomizados (Witayavanitkul *et al.* 2013). Além disso, estudos mostram que a testosterona inibe, alostericamente, o LTCC, *in vitro*, de forma semelhante ao nifedipino (Hall *et al.* 2006).

A despeito da aludida alteração engendrada pela testosterona na atividade da SERCA2a e na sensibilidade do RyR, não foram observadas diferenças significativas a respeito das expressões gênicas dos mesmos, no presente estudo. Embora esta observação indique ausência de participação destas moléculas neste modelo, os seus respectivos papéis, no contexto abordado por este estudo, não devem ser descartados. É possível que a interação dos EA com SERCA2a e RyR se dê ao nível pós-transcricional e, deste modo, não seria detectado pelo PCR-RT. Não obstante, é essencial analisar outros alvos relacionados ao balanço do cálcio, como o LTCC, fosfolambam, NCX e a bomba sarcolemar de cálcio.

Neste contexto, sabe-se que as ROS são capazes de modular a atividade de diversas proteínas através de reações de oxidação/redução, o que culmina na alteração da atividade enzimática sem, porém, alterações quantitativas na biodisponibilidade proteica. De fato, o peróxido de hidrogênio é capaz de oxidar resíduos de cisteína, inclusive na SERCA2a, favorecendo a

redução na atividade desta enzima, o que é revertido pelo aumento da biodisponibilidade da catalase (Qin *et al.* 2013).

Enfim, pouco se sabe a respeito dos efeitos da sobrecarga de EA na cinética do cálcio, em cardiomiócitos, de modo que são necessários mais estudos para elucidar este aspecto das síndromes cardiovasculares provocadas pelos fármacos em questão. Por outro lado, através do presente estudo, é possível constatar que não há ingerência significativa no âmbito transcricional da SERCA2a e RyR, o que, por sua vez, enaltece outros mecanismos de fisiopatológicos engendrados pelos EA.

6.8 ESTRESSE OXIDATIVO: POSSÍVEL EPICÊNTRRO

Diversos estudos destacam o papel crítico desempenhado pelas ROS nas disfunções cardiovasculares, como hipertrofia, arritmogênese e injúria de isquemia/reperfusão. Tendo em vista que a administração crônica de EA, na fase adulta, atenua a atividade de enzimas antioxidantes (Chaves *et al.* 2006), é possível que as ROS sejam importantes, talvez o epicentro, dos prejuízos nas propriedades elétricas e mecânicas, até mesmo na área de infarto, observados nos animais após sobrecarga de EA.

Deste modo, pela primeira vez, a atividade de enzimas envolvidas na síntese de ROS no microambiente cardíaco foi estudada, após administração crônica de EA. Funcionalmente, as enzimas da família Nox catalisam a oxidação do NADPH e, subseqüentemente, redução do oxigênio, gerando ânion superóxido (Guzik *et al.* 2006). Por partilharem grande parte da seqüência de aminoácidos, as enzimas da Duox também promovem a referida reação. Contudo, por apresentarem uma porção peroxidase, no domínio N-terminal, as Duox também são capazes de catalisar a redução do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Além disso, entre o domínio homólogo às NOX e o domínio N-terminal, as Duox apresentam domínios de regulação do cálcio, o qual explica, em parte, porque a sobrecarga de cálcio aumenta a síntese de ROS (Ameziane-El-Hassani *et al.* 2005).

No entanto, não foi observada nenhuma alteração nas atividades de NOX e DUOX em corações de ratos *Wistar* adultos, após sobrecarga crônica de EA na fase adolescente. Por outro lado, isto não reduz a importância da ingerência fisiopatológica modulada pelas ROS nas disfunções cardiovasculares provocadas pelos EA, tão pouco na injúria de isquemia/reperfusão.

Outra possibilidade envolve a alteração na maquinaria antioxidante, visto que já foi observado, previamente, redução nas atividades da SOD e GPX em corações de ratos *Wistar* adultos, em modelo de isquemia/reperfusão de corações isolados, após administração crônica de EA (Chaves *et al.* 2006). Corroborando esta observação, expressão gênica e proteica de SOD1 no coração de ratos *Wistar* adultos, em modelo de isquemia/reperfusão de corações isolados, aumenta sobremaneira, após submissão à orquiectomia, sendo estes eventos revertidos pela administração de testosterona e DHT (Huang *et al.* 2010).

Em contraste, a expressão gênica das isoformas de SOD 1, 2 e 3, assim como GPx 1 e 3, não foram alteradas pela sobrecarga de EA, em comparação ao grupo controle, após a reperfusão cardíaca, no presente estudo. Por conseguinte, estes achados erguem, novamente, ponderações a respeito de diversos fatores peculiares ao modelo utilizado pelo presente estudo. Fundamentalmente, esta foi a primeira vez na qual as expressões gênicas de SOD e GPx em corações de ratos *Wistar* adultos foram avaliadas após sobrecarga de propionato de testosterona, mas em especial ao longo da adolescência, após indução da injúria de isquemia/reperfusão.

A redução na atividade de SOD e GPx observados por Chaves e colaboradores, após sobrecarga de decanoato de nandrolona em ratos *Wistar* adultos, pode ser decorrente da redução na biodisponibilidade, assim como da redução na atividade catalítica, per se, das referidas enzimas, sem, necessariamente, envolver a maquinaria transcricional. Desta maneira, os fatores idade, abordagem terapêutica e o tipo de análise molecular devem ser levados em consideração na comparação destes estudos. Assim, é possível

que as atividades de SOD e GPx sejam afetadas no modelo utilizado pelo presente estudo, em contraste ao que foi observado no âmbito transcricional.

Contrariando as observações supracitadas, a expressão gênica da catalase foi, significativamente, reduzida após a reperfusão no grupo EA. Corroborando este achado, o nível sérico de testosterona, assim como a administração crônica de propionato de testosterona, está negativamente correlacionado à atividade da catalase em corações de ratos Wistar adultos (Sadowska-Krępa *et al.* 2011). Por outro lado, a exposição crônica de ratos Wistar adultos ao decanoato de nandrolona não surtiu efeito na atividade da catalase, após a reperfusão de corações isolados (Chaves *et al.* 2006).

A catalase exerce um papel chave na homeostase celular ao converter o H_2O_2 em O_2 e H_2O . Neste contexto, o peróxido de hidrogênio contribui, criticamente, para a extensão da injúria de isquemia/reperfusão. A princípio, camundongos transgênicos que apresentam hiperexpressão da catalase demonstram redução de até 40% na área de infarto, enquanto a recuperação da função contrátil é cerca de 300% maior do que animais controle, em modelo de isquemia/reperfusão global em corações isolados através do aparato de *Langendorff* (Li *et al.* 1997). Além disso, ao longo prazo, a redução da biodisponibilidade de H_2O_2 está correlacionada com a redução na expressão de genes pró-inflamatórios e profibróticos, além da redução na expressão de colágeno 1A (Pendergrass *et al.* 2011).

Não obstante aos efeitos sobre o remodelamento cardíaco, a incubação de cardiomiócitos em meio com peróxido de hidrogênio aumenta, significativamente, a concentração intracelular de cálcio, através da interação com a SERCA2a, receptores de rianodina e trifosfato de inositol (Wang *et al.* 1999). Assim, a perfusão de corações isolados com 0,1 – 0,5 mmol/L de H_2O_2 provoca redução da PDVE, da dP/dt máxima e mínima (Wang *et al.* 1999). Em face da indução da injúria de isquemia/reperfusão, em corações isolados, a perfusão dos corações com H_2O_2 prejudica a recuperação da PDVE, em virtude do aumento na pressão distólica ventricular, assim como das velocidades de contração e relaxamento, ao longo da reperfusão (Myers 1998).

Com base nas observações anteriores, é possível enaltecer o papel crítico do peróxido de hidrogênio na menor resiliência observada nos corações do grupo à injúria de isquemia/reperfusão. Embora a relação causa-efeito não tenha sido o foco do presente estudo, a menor expressão gênica da catalase ratifica a hipótese excogitada, isto é, de que o estresse oxidativo ocorre concomitantemente à maior susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão em corações de ratos *Wistar* adultos, após sobrecarga de EA ao longo da adolescência.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, observou-se, pela primeira vez, que a administração crônica de EA, durante a fase adolescente de ratos *Wistar*, aumenta, sobremaneira, a susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão na fase adulta, em modelo de coração isolado, através do aparato de *Langendorff*. Essencialmente, a administração de EA, *per se*, favoreceu o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, marcada por reativação do padrão de expressão gênica fetal, ilustrado pelo aumento na razão $MHC\beta/MHC\alpha$. Consonante com estes padrões, fenotípico e genotípico, cardíacos, observou-se maior reatividade vascular nos anéis de aorta isolados dos animais do grupo EA.

Mediante submissão à isquemia global, os corações do grupo EA desenvolveram áreas de infarto superiores, o que, por sua vez, ratifica a hipótese do aumento na susceptibilidade à injúria de isquemia/reperfusão, após administração de EA na fase adolescente. Condizente com o desenvolvimento de hipertrofia, reprogramação gênica fetal e maior área de infarto, o desempenho mecânico cardíaco, ao longo da reperfusão, também foi, relevantemente, prejudicado no grupo EA. Precisamente, a recuperação da pressão diastólica final foi significativamente atenuada, conduzindo a PDVE a valores inferiores ao grupo controle. Ademais, a recuperação das velocidades de relaxamento e contração, durante a reperfusão, também foram, relevantemente, reduzidas pela testosterona. No entanto, estas alterações não foram acompanhadas de variações na expressão gênica de SERCA2a e RyR.

Enfim, os corações de ratos previamente tratados com propionato de testosterona, ao longo da adolescência, também apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de episódios arrítmicos, através da maior incidência de batimentos ventriculares prematuros, taquicardia/*flutter* ventricular e fibrilação ventricular, em comparação com o grupo controle.

Concomitante às disfunções mecânicas e elétricas cardíacas, observou-se maior susceptibilidade ao estresse oxidativo no coração de ratos tratados com EA na adolescência, ainda que de forma modesta, ilustrada pela menor

expressão gênica de catalase. Contudo, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas síndromes cardiovasculares engendradas pelos EA, particularmente, na injúria de isquemia/reperfusão, e especialmente na condição de consumo ao longo da adolescência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 (SIH/SUS), S. D. I. H. D. S. **Valor serviços hospitalares segundo Região**. SAÚDE, M. D. Capítulo CID-10: IX. Doenças do aparelho circulatório: Período: Dez/2014 p. 2014.
- 2 AHLGRIM, C.; GUGLIN, M. Anabolics and cardiomyopathy in a bodybuilder: case report and literature review. *J Card Fail*, v. 15, n. 6, p. 496-500, Aug 2009.
- 3 ALMAAS, V. M. et al. Increased amount of interstitial fibrosis predicts ventricular arrhythmias, and is associated with reduced myocardial septal function in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Europace*, v. 15, n. 9, p. 1319-27, Sep 2013.
- 4 ALTSCHULD, R. A.; HOSTETLER, J. R.; BRIERLEY, G. P. Response of isolated rat heart cells to hypoxia, re-oxygenation, and acidosis. *Circ Res*, v. 49, n. 2, p. 307-16, Aug 1981.
- 5 ALVES, M. J. et al. Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users. *Med Sci Sports Exerc*, v. 42, n. 5, p. 865-71, May 2010.
- 6 AMEZIANE-EL-HASSANI, R. et al. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem*, v. 280, n. 34, p. 30046-54, Aug 2005.
- 7 AON, M. A. et al. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, v. 278, n. 45, p. 44735-44, Nov 2003.
- 8 APPELL, H. J. et al. Ultrastructural and morphometric investigations on the effects of training and administration of anabolic steroids on the myocardium of guinea pigs. *Int J Sports Med*, v. 4, n. 4, p. 268-74, Nov 1983.
- 9 AZHAR, S.; MENON, K. Receptor-mediated gonadotropin action in the ovary. Rat luteal cells preferentially utilize and are acutely dependent upon the plasma lipoprotein-supplied sterols in gonadotropin-stimulated steroid production. *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 13, p. 6548-6555, 1981.
- 10 BAE, S.; ZHANG, L. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 315, n. 3, p. 1125-35, Dec 2005.

- 11 BARRON, H. V. et al. Use of reperfusion therapy for acute myocardial infarction in the United States Data from the National Registry of Myocardial Infarction 2. *Circulation*, v. 97, n. 12, p. 1150-1156, 1998.
- 12 BARTH, W. et al. Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J Mol Cell Cardiol*, v. 32, n. 2, p. 273-84, Feb 2000.
- 13 BEKKERING, S. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 34, n. 8, p. 1731-1738, 2014.
- 14 BELL, J. R. et al. Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection. *Endocrinology*, v. 152, n. 12, p. 4937-47, Dec 2011.
- 15 BERNAUER, W.; ERNENPUTSCH, I. Antagonistic effects of alpha-adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme release, and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 338, n. 1, p. 88-95, Jul 1988.
- 16 BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 93, n. 1, p. 43-8, Jan 2005.
- 17 BISHOP, S.; WHITE, F.; BLOOR, C. Regional myocardial blood flow during acute myocardial infarction in the conscious dog. *Circulation research*, v. 38, n. 5, p. 429-438, 1976.
- 18 BORUTAITE, V. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, v. 35, n. 4, p. 357-66, Apr 2003.
- 19 BRADFORD, M. A rapid and sensitive technique to determine protein concentrations. *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 20 BRAUNWALD, E.; KLONER, R. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, v. 66, n. 6, p. 1146-1149, 1982.
- 21 BRILLA, C. G.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*, v. 69, n. 1, p. 107-15, Jul 1991.

- 22 BROWN-SÉQUARD, C. E. On a New Therapeutic Method Consisting in the Use of Organic Liquids Extracted from Glands and Other Organs. *Br Med J*, v. 1, n. 1692, p. 1145-7, Jun 1893.
- 23 BROWN, D. A. et al. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol*, v. 564, n. Pt 2, p. 619-30, Apr 2005.
- 24 CALOVINI, T.; HAASE, H.; MORANO, I. Steroid-hormone regulation of myosin subunit expression in smooth and cardiac muscle. *J Cell Biochem*, v. 59, n. 1, p. 69-78, Sep 1995.
- 25 CARLINI, E. et al. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país. São Paulo: Cebrid/Unifesp, 2002.
- 26 CARLINI, E. V Levantamento Nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras: 2004. In: (Ed.). **V Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras: 2004**: UNIFESP Centro Brasileiro de informações sobre Drogas Psicotrópicas, 2005.
- 27 _____. IV Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras - 2010. In: (Ed.). **IV Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras - 2010**: UNIFESP Centro Brasileiro de informações sobre Drogas Psicotrópicas, 2011.
- 28 CARLINI, E. A. **II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005**. Senad, 2007.
- 29 CASAGRANDE, V. et al. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 1, p. 74-81, 2012.
- 30 CAVE, A. C. et al. ATP synthesis during low-flow ischemia influence of increased glycolytic substrate. *Circulation*, v. 101, n. 17, p. 2090-2096, 2000.
- 31 CHAN, M. Y. et al. Long-term mortality of patients undergoing cardiac catheterization for ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*, v. 119, n. 24, p. 3110-3117, 2009.

- 32 CHAVES, E. A. et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 99, n. 4-5, p. 223-30, Jun 2006.
- 33 CHEN, X. et al. Ca²⁺ Influx–Induced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Overload Causes Mitochondrial-Dependent Apoptosis in Ventricular Myocytes. *Circulation research*, v. 97, n. 10, p. 1009-1017, 2005.
- 34 CHEN, Y. F.; NAFTILAN, A. J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*, v. 19, n. 5, p. 456-63, May 1992.
- 35 CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src–dependent pathways. *Hypertension*, v. 59, n. 6, p. 1263-1271, 2012.
- 36 COHEN, M. V.; YANG, X.-M.; DOWNEY, J. M. The pH hypothesis of postconditioning staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, v. 115, n. 14, p. 1895-1903, 2007.
- 37 COOPER, R. et al. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the United States findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation*, v. 102, n. 25, p. 3137-3147, 2000.
- 38 COSEMANS, J. M. et al. Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow. *Blood*, v. 117, n. 2, p. 651-660, 2011.
- 39 COSTARELLA, C. E. et al. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 277, n. 1, p. 34-9, Apr 1996.
- 40 CYBULSKY, M. I.; GIMBRONE, M. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, v. 251, n. 4995, p. 788-791, 1991.
- 41 DAI, D. F. et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ Res*, v. 108, n. 7, p. 837-46, Apr 2011.
- 42 DAVIDSON, S. M. et al. Slow calcium waves and redox changes precede mPTP opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. *Cardiovascular research*, p. cvr349, 2011.
- 43 DEMYANETS, S. et al. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 31, n. 9, p. 2080-2089, 2011.

- 44 DETEN, A. et al. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovascular research*, v. 55, n. 2, p. 329-340, 2002.
- 45 DING, A. Q.; STALLONE, J. N. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n. 6, p. 2742-2750, 2001.
- 46 DOROSHOW, J. H.; DAVIES, K. J. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem*, v. 261, n. 7, p. 3068-74, Mar 1986.
- 47 DOTSON, J. L.; BROWN, R. T. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatr Clin North Am*, v. 54, n. 4, p. 761-9, xi, Aug 2007a.
- 48 _____. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatric Clinics of North America*, v. 54, n. 4, p. 761-769, 2007b.
- 49 DUDNAKOVA, T. V. et al. Alterations in myocardial ultrastructure and protein expression after a single injection of isoproterenol. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 252, n. 1-2, p. 173-181, 2003.
- 50 DURANT, R. H. et al. Use of multiple drugs among adolescents who use anabolic steroids. *N Engl J Med*, v. 328, n. 13, p. 922-6, Apr 1993.
- 51 EITZMAN, D. T. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery. *Blood*, v. 96, n. 13, p. 4212-4215, 2000.
- 52 ENDEMANN, D. H. et al. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 43, n. 6, p. 1252-7, Jun 2004.
- 53 ENDOH, A. et al. The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 81, n. 10, p. 3558-3565, 1996.
- 54 ER, F. et al. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium*, v. 41, n. 5, p. 467-77, May 2007.
- 55 FANTON, L. et al. Heart lesions associated with anabolic steroid abuse: comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits. *Exp Toxicol Pathol*, v. 61, n. 4, p. 317-23, Jul 2009.

- 56 FERRARI, M.; MCANELLY, M.; ZAKON, H. Individual variation in and androgen-modulation of the sodium current in electric organ. *The Journal of neuroscience*, v. 15, n. 5, p. 4023-4032, 1995.
- 57 FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665-8, Sep 2001.
- 58 FERRER, M. et al. Chronic treatment with the anabolic steroid, nandrolone, inhibits vasodilator responses in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol*, v. 252, n. 2, p. 233-41, Feb 1994.
- 59 FINESCHI, V. et al. Anabolic steroid- and exercise-induced cardio-depressant cytokines and myocardial β 1 receptor expression in CD1 mice. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 12, n. 2, p. 275-84, Feb 2011.
- 60 FORTEZA, R. et al. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 32, n. 5, p. 462-9, May 2005.
- 61 FRANCIS, J. et al. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 281, n. 5, p. R1734-R1745, 2001.
- 62 FRANQUINI, J. V. et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids*, v. 78, n. 3, p. 379-85, Mar 2013.
- 63 FRENCH, J. P. et al. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 290, n. 1, p. H128-H136, 2006.
- 64 FRIEHS, I.; DEL NIDO, P. J. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg*, v. 75, n. 2, p. S678-84, Feb 2003.
- 65 FULLER, W. et al. Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovasc Res*, v. 57, n. 4, p. 1044-51, Mar 2003.
- 66 GINKS, W. et al. Coronary artery reperfusion: II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *Journal of Clinical Investigation*, v. 51, n. 10, p. 2717, 1972.
- 67 GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 127, n. 1, p. e6-e245, Jan 2013.

- 68 _____ . An effective approach to high blood pressure control: a science advisory from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the Centers for Disease Control and Prevention. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 63, n. 12, p. 1230-1238, 2014.
- 69 GOLDEN, K. L. et al. Gonadectomy alters myosin heavy chain composition in isolated cardiac myocytes. *Endocrine*, v. 24, n. 2, p. 137-40, Jul 2004.
- 70 GONZALES, R. J.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 286, n. 2, p. H552-60, Feb 2004.
- 71 GONZALES, R. J. et al. Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 289, n. 2, p. H578-85, Aug 2005.
- 72 GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D. J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology*, v. 136, n. 5, p. 2052-2059, 1995.
- 73 GRINO, P. B. et al. Androgen Resistance Associated With a Qualitative Abnormality of the Androgen Receptor and Responsive to High Dose Androgen Therapy*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 68, n. 3, p. 578-584, 1989.
- 74 GROHÉ, C. et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*, v. 416, n. 1, p. 107-12, Oct 1997.
- 75 GUO, C. et al. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via the mitochondrial pathway. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 9, p. 11923-11940, 2012.
- 76 GUO, Z. et al. Nongenomic testosterone calcium signaling Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 33, p. 29600-29607, 2002.
- 77 GUSTAFSON, T. A. et al. Hormonal regulation of myosin heavy chain and alpha-actin gene expression in cultured fetal rat heart myocytes. *J Biol Chem*, v. 262, n. 27, p. 13316-22, Sep 1987.
- 78 GUTH, B. D. et al. Regional myocardial blood flow, function and metabolism using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy during ischemia and reperfusion in dogs. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 10, n. 3, p. 673-681, 1987.

- 79 GUZIK, T. J. et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, n. 2, p. 333-9, Feb 2006.
- 80 HALL, J. et al. Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology*, v. 147, n. 6, p. 2675-80, Jun 2006.
- 81 HAN, T. S.; BOULOUX, P. M. What is the optimal therapy for young males with hypogonadotropic hypogonadism? *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 72, n. 6, p. 731-7, Jun 2010.
- 82 HARADA, M. et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*, v. 11, n. 3, p. 305-11, Mar 2005.
- 83 HASSAN, A. F.; KAMAL, M. M. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int J Health Sci (Qassim)*, v. 7, n. 1, p. 47-60, Jan 2013.
- 84 HAYASHIDANI, S. et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*, v. 108, n. 17, p. 2134-2140, 2003.
- 85 HERNÁNDEZ, J. S. et al. Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. *J Cell Mol Med*, v. 18, n. 4, p. 709-20, Apr 2014.
- 86 HEYNDRICKX, G. et al. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 234, n. 6, p. H653-H659, 1978.
- 87 HUANG, C. et al. Testosterone-down-regulated Akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanism involving BAD, Bcl-2 and FOXO3a. *J Surg Res*, v. 164, n. 1, p. e1-11, Nov 2010.
- 88 HUANG, W.-C. et al. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-κB. 2012.
- 89 HUIE, M. J. An acute myocardial infarction occurring in an anabolic steroid user. *Med Sci Sports Exerc*, v. 26, n. 4, p. 408-13, Apr 1994.
- 90 IMAHASHI, K. et al. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, v. 95, n. 7, p. 734-41, Oct 2004.

- 91 _____ . Overexpression of the Na⁺/H⁺ exchanger and ischemia-reperfusion injury in the myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, n. 5, p. H2237-47, May 2007.
- 92 IZUMO, S. et al. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*, v. 79, n. 3, p. 970-7, Mar 1987.
- 93 JENSTER, G. et al. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 13, p. 7341-7346, 1995.
- 94 JIANG, L. et al. Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis. *Hypertension*, v. 60, n. 5, p. 1192-1199, 2012.
- 95 JOHNSON, J. L. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 31, n. 9, p. e35-e44, 2011.
- 96 JOHNSTON, L. D. et al. Monitoring the Future: National Survey Results on Drug Use, 1975-2009. Volume I: Secondary School Students. NIH Publication No. 10-7584. *National Institute on Drug Abuse (NIDA)*, 2010.
- 97 KANNEL, W. B. et al. Coronary heart disease and atrial fibrillation: the Framingham Study. *Am Heart J*, v. 106, n. 2, p. 389-96, Aug 1983.
- 98 KANNEL, W. B. Left ventricular hypertrophy as a risk factor: the Framingham experience. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, v. 9, n. 2, p. S3-8; discussion S8-9, 1991.
- 99 KASIKCIOGLU, E. et al. Aortic elastic properties in athletes using anabolic-androgenic steroids. *Int J Cardiol*, v. 114, n. 1, p. 132-4, Jan 2007.
- 100 KENNEDY, M. C.; LAWRENCE, C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust*, v. 158, n. 5, p. 346-8, Mar 1993.
- 101 KETTLE, A. J.; CARR, A. C.; WINTERBOURN, C. C. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med*, v. 17, n. 2, p. 161-4, Aug 1994.
- 102 KHALIL, P. N. et al. Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine

- myocardial ischemia/reperfusion model. *European journal of pharmacology*, v. 528, n. 1, p. 124-131, 2005.
- 103 KHURI, S. F. et al. The significance of the late fall in myocardial PCO₂ and its relationship to myocardial pH after regional coronary occlusion in the dog. *Circulation research*, v. 56, n. 4, p. 537-547, 1985.
- 104 KIRCHHOFF, M. et al. Incidence of myocardial infarction in the Danish MONICA population 1982-1991. *Int J Epidemiol*, v. 28, n. 2, p. 211-8, Apr 1999.
- 105 KLEIN, H. H. et al. Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation*, v. 102, n. 16, p. 1977-82, Oct 2000.
- 106 KRAUSE, S.; HESS, M. L. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia. *Circulation research*, v. 55, n. 2, p. 176-184, 1984.
- 107 KUBLI-GARFIAS, C. Ab initio comparative study of the electronic structure of testosterone, epitestosterone and androstenedione. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 422, n. 1, p. 167-177, 1998.
- 108 KUIJPERS, M. J. et al. Factor XII regulates the pathological process of thrombus formation on ruptured plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 34, n. 8, p. 1674-1680, 2014.
- 109 KUIL, C. W.; BERREVOETS, C. A.; MULDER, E. Ligand-induced Conformational Alterations of the Androgen Receptor Analyzed by Limited Trypsinization STUDIES ON THE MECHANISM OF ANTIANDROGEN ACTION. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 46, p. 27569-27576, 1995.
- 110 KUSUMOTO, K.; HAIST, J. V.; KARMAZYN, M. Na(+)/H(+) exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 280, n. 2, p. H738-45, Feb 2001.
- 111 LAGRANHA, C. J. et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res*, v. 106, n. 11, p. 1681-91, Jun 2010.
- 112 LANE, H. A. et al. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *Eur J Clin Invest*, v. 36, n. 7, p. 483-8, Jul 2006.

- 113 LEVY, B. I.; DURIEZ, M.; SAMUEL, J. L. Coronary microvasculature alteration in hypertensive rats. Effect of treatment with a diuretic and an ACE inhibitor. *Am J Hypertens*, v. 14, n. 1, p. 7-13, Jan 2001.
- 114 LEVY, D. et al. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am J Cardiol*, v. 60, n. 7, p. 560-5, Sep 1987.
- 115 LI, G. et al. Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 273, n. 3, p. H1090-H1095, 1997.
- 116 LIAO, R.; PODESSER, B. K.; LIM, C. C. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 303, n. 2, p. H156-67, Jul 2012.
- 117 LOOR, G. et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia–reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 7, p. 1382-1394, 2011.
- 118 LOSCHEN, G. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, v. 42, n. 1, p. 68-72, May 1974.
- 119 LOWE, J. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Cardiac rigor mortis in dogs. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 11, n. 10, p. 1017-1031, 1979.
- 120 LUCHNER, A. et al. Evaluation of brain natriuretic peptide as marker of left ventricular dysfunction and hypertrophy in the population. *Journal of hypertension*, v. 18, n. 8, p. 1121-1128, 2000.
- 121 LUIJKX, T. et al. Anabolic androgenic steroid use is associated with ventricular dysfunction on cardiac MRI in strength trained athletes. *Int J Cardiol*, v. 167, n. 3, p. 664-8, Aug 2013.
- 122 LUNDBERG, A. M. et al. Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in haematopoietic cells promotes atherosclerosis. *Cardiovascular research*, v. 99, n. 2, p. 364-373, 2013.
- 123 MA, X. L. et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, v. 99, n. 13, p. 1685-91, Apr 1999.
- 124 MACKAY, J. et al. **The atlas of heart disease and stroke.** World Health Organization, 2004. ISBN 9241562765.

- 125 MAIOR, A. S. et al. Abnormal cardiac repolarization in anabolic androgenic steroid users carrying out submaximal exercise testing. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 37, n. 12, p. 1129-33, Dec 2010.
- 126 MANGAT, R. et al. Arterial retention of remnant lipoproteins ex vivo is increased in insulin resistance because of increased arterial biglycan and production of cholesterol-rich atherogenic particles that can be improved by ezetimibe in the JCR: LA-cp rat. *Journal of the American Heart Association*, v. 1, n. 5, p. e003434, 2012.
- 127 MARAVELIAS, C. et al. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett*, v. 158, n. 3, p. 167-75, Sep 2005.
- 128 MARON, B. J. Sudden death in young athletes. *N Engl J Med*, v. 349, n. 11, p. 1064-75, Sep 2003.
- 129 MARQUES-NETO, S. R. et al. 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. *Cardiovasc Drugs Ther*, v. 28, n. 2, p. 125-35, Apr 2014.
- 130 MARQUES NETO, S. R. et al. The blockade of angiotensin AT1 and aldosterone receptors protects rats from synthetic androgen-induced cardiac autonomic dysfunction. *Acta Physiol (Oxf)*, v. 208, n. 2, p. 166-71, Jun 2013.
- 131 MARTINDALE, J. J.; METZGER, J. M. Uncoupling of increased cellular oxidative stress and myocardial ischemia reperfusion injury by directed sarcolemma stabilization. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 67, p. 26-37, 2014.
- 132 MCGOVERN, P. G. et al. Recent trends in acute coronary heart disease—mortality, morbidity, medical care, and risk factors. *New England Journal of Medicine*, v. 334, n. 14, p. 884-890, 1996.
- 133 MEDEI, E. et al. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: cellular, ionic and molecular mechanism. *J Mol Cell Cardiol*, v. 49, n. 2, p. 165-75, Aug 2010.
- 134 MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. World Health Organization, 2011. ISBN 9241564377.
- 135 MINTO, C. F. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nandrolone esters in oil vehicle: effects of ester, injection site and injection volume. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 281, n. 1, p. 93-102, Apr 1997.
- 136 MISAO, J. et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human

- hearts with myocardial infarction. *Circulation*, v. 94, n. 7, p. 1506-1512, 1996.
- 137 MIYATA, S. et al. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*, v. 86, n. 4, p. 386-90, Mar 2000.
- 138 MOENS, A. L. et al. High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury. *Circulation*, v. 117, n. 14, p. 1810-1819, 2008.
- 139 MONTAÑO, L. M. et al. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology*, v. 149, n. 5, p. 2517-26, May 2008.
- 140 MORALES, A. J. et al. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 78, n. 6, p. 1360-1367, 1994.
- 141 MORANO, I. et al. Regulation of myosin heavy chain expression in the hearts of hypertensive rats by testosterone. *Circ Res*, v. 66, n. 6, p. 1585-90, Jun 1990.
- 142 MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 131, n. 4, p. e29-322, Jan 2015.
- 143 MULLIGAN, K. et al. Effect of nandrolone decanoate therapy on weight and lean body mass in HIV-infected women with weight loss: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arch Intern Med*, v. 165, n. 5, p. 578-85, Mar 2005.
- 144 MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research*, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.
- 145 MYERS, C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol*, v. 25, n. 4 Suppl 10, p. 10-4, Aug 1998.
- 146 NAGABABU, E.; CHREST, F. J.; RIFKIND, J. M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, v. 1620, n. 1-3, p. 211-7, Mar 2003.
- 147 NAKAGAMI, H.; TAKEMOTO, M.; LIAO, J. K. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, v. 35, n. 7, p. 851-9, Jul 2003.

- 148 NARITA, M. et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 25, p. 14681-6, Dec 1998.
- 149 NICOLAY, K.; DE KRUIJFF, B. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. *Biochim Biophys Acta*, v. 892, n. 3, p. 320-30, Jul 1987.
- 150 NILSSON, S. Androgenic anabolic steroid use among male adolescents in Falkenberg. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 48, n. 1, p. 9-11, 1995.
- 151 NILSSON, S. et al. The prevalence of the use of androgenic anabolic steroids by adolescents in a county of Sweden. *Eur J Public Health*, v. 11, n. 2, p. 195-7, Jun 2001.
- 152 NORMINGTON, K.; RUSSELL, D. W. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J Biol Chem*, v. 267, n. 27, p. 19548-54, Sep 1992.
- 153 O'GARA, P. T. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 61, n. 4, p. e78-e140, 2013.
- 154 OIKARINEN, L. et al. QRS duration and QT interval predict mortality in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension*, v. 43, n. 5, p. 1029-34, May 2004.
- 155 OJEDA, N. B. et al. Enhanced sensitivity to acute angiotensin II is testosterone dependent in adult male growth-restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 298, n. 5, p. R1421-7, May 2010.
- 156 OKOSHI, M. P. et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail*, v. 10, n. 6, p. 511-8, Dec 2004.
- 157 OLIVARES, E. L. et al. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology*, v. 148, n. 10, p. 4786-92, Oct 2007.
- 158 _____. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. *Physiol Behav*, v. 126, p. 15-24, Mar 2014.
- 159 OPIE, L. H.; BRUYNEEL, K.; OWEN, P. Effects of glucose, insulin and potassium infusion on tissue metabolic changes within first hour of

- myocardial infarction in the baboon. *Circulation*, v. 52, n. 1, p. 49-57, Jul 1975.
- 160 PAGONIS, T. A. et al. Psychiatric side effects induced by supraphysiological doses of combinations of anabolic steroids correlate to the severity of abuse. *Eur Psychiatry*, v. 21, n. 8, p. 551-62, Dec 2006.
- 161 PAPAKONSTANTI, E. A. et al. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Molecular Endocrinology*, v. 17, n. 5, p. 870-881, 2003.
- 162 PARADIES, G. et al. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett*, v. 466, n. 2-3, p. 323-6, Jan 2000.
- 163 PARK, J.-G. et al. Evaluation of VCAM-1 antibodies as therapeutic agent for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, v. 226, n. 2, p. 356-363, 2013.
- 164 PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Med Sci Sports Exerc*, v. 38, n. 4, p. 644-51, Apr 2006.
- 165 PARSONS, B. et al. The effect of pH on the Ca²⁺ affinity of the Ca²⁺ regulatory sites of skeletal and cardiac troponin C in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil*, v. 18, n. 5, p. 599-609, Oct 1997.
- 166 PATKI, K. C.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 31, n. 7, p. 938-944, 2003.
- 167 PAVÓN, N. et al. Sexual hormones: effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia-reperfusion in adult rats. Gender difference. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 132, n. 1-2, p. 135-46, Oct 2012.
- 168 PAYNE, A. H.; DOWNING, J. R.; WONG, K.-L. Luteinizing Hormone Receptors and Testosterone Synthesis in Two Distinct Populations of Leydig Cells*. *Endocrinology*, v. 106, n. 5, p. 1424-1429, 1980.
- 169 PENDERGRASS, K. D. et al. Temporal effects of catalase overexpression on healing after myocardial infarction. *Circulation: Heart Failure*, v. 4, n. 1, p. 98-106, 2011.
- 170 PENNA, C. et al. Ischemia/reperfusion injury is increased and cardioprotection by a postconditioning protocol is lost as cardiac

- hypertrophy develops in nandrolone treated rats. *Basic Res Cardiol*, v. 106, n. 3, p. 409-20, May 2011.
- 171 PEREIRA-JUNIOR, P. P. et al. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol*, v. 96, n. 5, p. 487-94, Mar 2006.
- 172 PFEFFER, M. A. et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*, v. 327, n. 10, p. 669-77, Sep 1992.
- 173 PI, Y. et al. Inhibition of reactive oxygen species generation attenuates TLR4-mediated proinflammatory and proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells. *Laboratory Investigation*, v. 93, n. 8, p. 880-887, 2013.
- 174 PITT, B. et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*, v. 348, n. 14, p. 1309-21, Apr 2003.
- 175 PORENTA, G. et al. Noninvasive determination of myocardial blood flow, oxygen consumption and efficiency in normal humans by carbon-11 acetate positron emission tomography imaging. *European journal of nuclear medicine*, v. 26, n. 11, p. 1465-1574, 1999.
- 176 PORRAS, A. et al. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell*, v. 15, n. 2, p. 922-33, Feb 2004.
- 177 PRABHAKAR, G. et al. Phosphocreatine restores high-energy phosphates in ischemic myocardium: Implication for off-pump cardiac revascularization. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 197, n. 5, p. 786-791, 2003.
- 178 QIN, F. et al. Hydrogen Peroxide–Mediated SERCA Cysteine 674 Oxidation Contributes to Impaired Cardiac Myocyte Relaxation in Senescent Mouse Heart. *Journal of the American Heart Association*, v. 2, n. 4, p. e000184, 2013.
- 179 RAEDSCHELDERS, K.; ANSLEY, D. M.; CHEN, D. D. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics*, v. 133, n. 2, p. 230-255, 2012.
- 180 RAZEGHI, P. et al. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, v. 104, n. 24, p. 2923-31, Dec 2001.

- 181 REIMER, K. A. et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, v. 56, n. 5, p. 786-794, 1977.
- 182 REIMER, K. A.; HILL, M. L.; JENNINGS, R. B. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 13, n. 2, p. 229-239, 1981.
- 183 REZKALLA, S. H. et al. No-reflow phenomenon following percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: incidence, outcome, and effect of pharmacologic therapy. *Journal of interventional cardiology*, v. 23, n. 5, p. 429-436, 2010.
- 184 ROCHA, F. L. et al. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, n. 6, p. H3575-83, Dec 2007.
- 185 ROSS, R. Pathogenesis of Atherosclerosis-Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*, v. 138, n. 5, p. S419, 1999.
- 186 RUIZ-MEANA, M. et al. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na⁺ through gap junctions. *Circulation research*, v. 85, n. 3, p. 280-287, 1999.
- 187 RYAN, K. J. Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem*, v. 234, n. 2, p. 268-72, Feb 1959.
- 188 SABA, S. et al. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 289, n. 4, p. H1456-67, Oct 2005.
- 189 SACHTLEBEN, T. R. et al. The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med Sci Sports Exerc*, v. 25, n. 11, p. 1240-5, Nov 1993.
- 190 SADOWSKA-KRĘPA, E. et al. High-dose testosterone propionate treatment reverses the effects of endurance training on myocardial antioxidant defenses in adolescent male rats. *Cardiovascular toxicology*, v. 11, n. 2, p. 118-127, 2011.
- 191 SANADA, S.; KOMURO, I.; KITAKAZE, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 301, n. 5, p. H1723-H1741, 2011.

- 192 SATOH, M. et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 288, n. 6, p. F1144-52, Jun 2005.
- 193 SCHMITT, M. M. et al. Endothelial junctional adhesion molecule-A guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation*, v. 129, n. 1, p. 66-76, 2014.
- 194 SCOTT, D. M.; WAGNER, J. C.; BARLOW, T. W. Anabolic steroid use among adolescents in Nebraska schools. *Am J Health Syst Pharm*, v. 53, n. 17, p. 2068-72, Sep 1996.
- 195 SHAFFER, P. L. et al. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 14, p. 4758-4763, 2004.
- 196 SHAROV, V. G. et al. Hypoxia, angiotensin-II, and norepinephrine mediated apoptosis is stimulus specific in canine failed cardiomyocytes: a role for p38 MAPK, Fas-L and cyclin D1. *Eur J Heart Fail*, v. 5, n. 2, p. 121-9, Mar 2003.
- 197 SILVESTRE, J. S. et al. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*, v. 99, n. 20, p. 2694-701, May 1999.
- 198 SIM, S. D. I. S. M. **Proporções de óbitos (%) por grupo de causas segundo unidade da Federação:** Acesso: 20 maio 2015 p. 2011.
- 199 SIMPSON, E. R.; DAVIS, S. R. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. *Endocrinology*, v. 142, n. 11, p. 4589-4594, 2001.
- 200 SOSNOVIK, D. E. et al. Fluorescence tomography and magnetic resonance imaging of myocardial macrophage infiltration in infarcted myocardium in vivo. *Circulation*, v. 115, n. 11, p. 1384-1391, 2007.
- 201 SPANBROEK, R. et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 3, p. 1238-1243, 2003.
- 202 STANLEY, L. L. EXPERIENCES IN TESTICLE TRANSPLANTATION. *Cal State J Med*, v. 18, n. 7, p. 251-3, Jul 1920.
- 203 STEG, P. et al. Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) ESC Guidelines for the management of acute

- myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*, v. 33, n. 20, p. 2569-2619, 2012.
- 204 STORER, T. W. et al. A randomized, placebo-controlled trial of nandrolone decanoate in human immunodeficiency virus-infected men with mild to moderate weight loss with recombinant human growth hormone as active reference treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 90, n. 8, p. 4474-82, Aug 2005.
- 205 SULLIVAN, M. L. et al. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis*, v. 41, n. 1, p. 1-15, 1998 Jul-Aug 1998.
- 206 SULLIVAN, M. L.; MARTINEZ, C. M.; GALLAGHER, E. J. Atrial fibrillation and anabolic steroids. *J Emerg Med*, v. 17, n. 5, p. 851-7, 1999 Sep-Oct 1999.
- 207 SUZUKI, M. et al. Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation*, v. 107, n. 5, p. 682-5, Feb 2003.
- 208 SWARTZ, D.; ZHANG, D.; YANCEY, K. Cross bridge-dependent activation of contraction in cardiac myofibrils at low pH. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 276, n. 5, p. H1460-H1467, 1999.
- 209 TAGARAKIS, C. V. et al. Anabolic steroids impair the exercise-induced growth of the cardiac capillary bed. *Int J Sports Med*, v. 21, n. 6, p. 412-8, Aug 2000.
- 210 TAKALA, T. E. et al. Effects of training and anabolic steroids on collagen synthesis in dog heart. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 62, n. 1, p. 1-6, 1991.
- 211 TAKII, T. et al. Trends in acute myocardial infarction incidence and mortality over 30 years in Japan: report from the MIYAGI-AMI Registry Study. *Circ J*, v. 74, n. 1, p. 93-100, Jan 2010.
- 212 TANNO, A. P. et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci*, v. 89, n. 17-18, p. 631-7, Oct 2011.
- 213 TAO, Z.-Y. et al. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life sciences*, v. 74, n. 12, p. 1561-1572, 2004.
- 214 TEICH, V.; ARAUJO, D. V. Estimativa de custo da síndrome coronariana aguda no Brasil. *Rev Bras Cardiol*, v. 24, n. 2, p. 85-94, 2011.

- 215 TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. A.; RANDALL, M. D. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol*, v. 135, n. 3, p. 735-40, Feb 2002.
- 216 THYGESEN, K. et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 60, n. 16, p. 1581-1598, 2012.
- 217 TORRE-AMIONE, G. et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*, v. 27, n. 5, p. 1201-6, Apr 1996.
- 218 TOSCHI, V. et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, v. 95, n. 3, p. 594-599, 1997.
- 219 TÓTH, M.; ZAKÁR, T. Different binding of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 alpha-reduced derivatives to the androgen receptor of the rat seminal vesicle: a step toward the understanding of the anabolic action of nortestosterone. *Endokrinologie*, v. 80, n. 2, p. 163-72, Oct 1982.
- 220 TRINDADE, D. C. et al. Role of renin-angiotensin system in development of heart failure induced by myocardial infarction in rats. *An Acad Bras Cienc*, v. 79, n. 2, p. 251-9, Jun 2007.
- 221 TU, J. V. et al. National trends in rates of death and hospital admissions related to acute myocardial infarction, heart failure and stroke, 1994-2004. *CMAJ*, v. 180, n. 13, p. E118-25, Jun 2009.
- 222 UETA, C. B. et al. Absence of myocardial thyroid hormone inactivating deiodinase results in restrictive cardiomyopathy in mice. *Mol Endocrinol*, v. 26, n. 5, p. 809-18, May 2012.
- 223 UNAL, B.; CRITCHLEY, J. A.; CAPEWELL, S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. *Circulation*, v. 109, n. 9, p. 1101-7, Mar 2004.
- 224 UNGERER, M. et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*, v. 123, n. 17, p. 1891-1899, 2011.
- 225 URHAUSEN, A.; HÖLPES, R.; KINDERMANN, W. One- and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v. 58, n. 6, p. 633-40, 1989.
- 226 VASUDEVAN, H.; YUEN, V. G.; MCNEILL, J. H. Testosterone-dependent increase in blood pressure is mediated by elevated Cyp4A

- expression in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem*, v. 359, n. 1-2, p. 409-18, Jan 2012.
- 227 VELAGALETI, R. S. et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, v. 118, n. 20, p. 2057-62, Nov 2008.
- 228 VERDECCHIA, P. et al. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation*, v. 81, n. 2, p. 528-36, Feb 1990.
- 229 VERMEULEN, A.; VERDONCK, L.; KAUFMAN, J. M. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 84, n. 10, p. 3666-3672, 1999.
- 230 VICENCIO, J. M. et al. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology*, v. 147, n. 3, p. 1386-1395, 2006.
- 231 WÅGSÄTER, D. et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr-/- Apob100/100 mouse. *International journal of molecular medicine*, v. 28, n. 2, p. 247-253, 2011.
- 232 WALSH, M. N. et al. Noninvasive estimation of regional myocardial oxygen consumption by positron emission tomography with carbon-11 acetate in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med*, v. 30, n. 11, p. 1798-808, 1989.
- 233 WANG, M. et al. Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 288, n. 2, p. E321-6, Feb 2005.
- 234 _____. Both endogenous and exogenous testosterone decrease myocardial STAT3 activation and SOCS3 expression after acute ischemia and reperfusion. *Surgery*, v. 146, n. 2, p. 138-44, Aug 2009.
- 235 _____. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 31, n. 9, p. 2044-2053, 2011.
- 236 WANG, X. et al. Mechanisms of Hydrogen Peroxide-Induced Increase in Intracellular Calcium in Cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, v. 4, n. 1, p. 41-48, Jan 1999.
- 237 WEI, G. Z. et al. Diastolic Ca²⁺ overload caused by Na⁺/Ca²⁺ exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning. *Eur J Pharmacol*, v. 572, n. 1, p. 1-11, Oct 2007.

- 238 WILSON, C. et al. Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*, v. 228, n. 12, p. 2399-407, Dec 2013.
- 239 WITAYAVANITKUL, N. et al. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 304, n. 3, p. H465-72, Feb 2013.
- 240 WOLDBAEK, P. R. et al. Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*, v. 59, n. 1, p. 122-31, Jul 2003.
- 241 XIN, W. et al. Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress–Related Myocardial Apoptosis by SERCA2a Gene Delivery in Ischemic Heart Disease. *Molecular Medicine*, v. 17, n. 3-4, p. 201, 2011.
- 242 XU, Y. et al. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 327, n. 2, p. 402-410, 2008.
- 243 YEH, R. W. et al. Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 23, p. 2155-2165, 2010.
- 244 YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, v. 357, n. 11, p. 1121-1135, 2007.
- 245 YOSHIDA, H.; KARMAZYN, M. Na(+)/H(+) exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 278, n. 1, p. H300-4, Jan 2000.
- 246 ZAUGG, M. et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol*, v. 187, n. 1, p. 90-5, Apr 2001.
- 247 ZHANG, S.-Z. et al. Involvement of the mitochondrial calcium uniporter in cardioprotection by ischemic preconditioning. *Life sciences*, v. 78, n. 7, p. 738-745, 2006.
- 248 ZHANG, Y. et al. Telmisartan delays myocardial fibrosis in rats with hypertensive left ventricular hypertrophy by TGF- β 1/Smad signal pathway. *Hypertens Res*, v. 37, n. 1, p. 43-9, Jan 2014.
- 249 ZHAO, J. F. et al. Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and

atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research*, v. 56, n. 5, p. 691-701, 2012.

- 250 ZHAO, Y.; WANG, Z. B.; XU, J. X. Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O₂⁻ and H₂O₂ in mitochondria. *J Biol Chem*, v. 278, n. 4, p. 2356-60, Jan 2003.
- 251 ZITZMANN, M.; BRUNE, M.; NIESCHLAG, E. Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, n. 11, p. 5030-7, Nov 2002.