

**TRATAMENTO COM DOSE SEMELHANTE À TERAPÊUTICA DE
OXANDROLONA DURANTE A ADOLESCÊNCIA PROMOVE REMODELAMENTO
CARDÍACO SEM ALTERAÇÃO DA CONTRATILIDADE NA FASE ADULTA EM
RATOS WISTAR**

EDGAR MENDES SOUZA WAN DER MAAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
VITÓRIA, MARÇO DE 2019

TRATAMENTO COM DOSE SEMELHANTE À TERAPÊUTICA DE OXANDROLONA DURANTE A ADOLESCÊNCIA PROMOVE REMODELAMENTO CARDÍACO SEM ALTERAÇÃO DA CONTRATILIDADE NA FASE ADULTA EM RATOS WISTAR

EDGAR MENDES SOUZA WAN DER MAAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ de _____ 2019

Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli – Orientadora, UFES

Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil- Co-orientadora e membro Externo, UVV

Profa. Dra. Lívia Carla de Melo Rodrigues - UFES

Prof. Dra. Sônia Alves Gouvea - Coordenadora do PPGCF – UFES

Wan Der Maas, Edgar Mendes Souza 1984

Tratamento com dose semelhante à terapêutica de oxandrolona durante a adolescência promove remodelamento cardíaco sem alteração da contratilidade na fase adulta em ratos wistar [Vitória] 2019. 67p., 29,7 cm (UFES, Msc. Ciências Fisiológicas, 2019).

Orientadora: Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli

Co-orientadora: Profa. Dra. Girlandia Alexandre Brasil

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Oxandrolona 2. Contratilidade cardíaca 3. Proteínas de mobilidade do Cálcio 4. Ratos pré-púberes 5. Disrupção do controle redox 6. Sistema renina angiotensina.

Quando entramos e passamos a fazer parte de um novo ambiente, devemos transformá-lo de alguma maneira.

Prof(a) Dra. Nazaré Bissoli (Reunião LHE 28/11/2018)

Dedico este trabalho à todas as pessoas que o tornaram possível, direta e indiretamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente ao Sagrado pelo dom da vida.

A minha mãe Maria Mendes por segurar meu mundo em suas costas e nunca reclamar. Agradeço também meu irmão Ely e meu padrasto Aguilar.

Agradeço a Professora Nazaré Souza Bissoli, com todo amor de minha alma, por ter me acolhido e me ensinado de modo sublime. Agradeço, também a Girlandia Alexandre Brasil pelo presente que foi este trabalho.

Aos meus instrutores Glauciene Januário de Sousa, Pollyana Meireles Lima Dalpiaz, Antônio Marcos Birocale e Phablo Wendell de Oliveira Costalonga, obrigado.

Antônio Ferreira de Melo Júnior, que além de trabalharmos diretamente, foi meu supervisor de estágio da segunda graduação, meu concrente, meu amigo, meu irmão, uma benção de Deus na minha vida, com sua ajuda foi possível prosseguir, trabalhando ombro a ombro de modo prazeroso e gratificante, te amo cara, muito obrigado mesmo.

Pollyana Peixoto, a Rainha do Mulvany, nossas marmitas divididas, longas conversas, muitas risadas, muito obrigado.

As minhas parceiras de IC e atuais colegas mestrandas Mariana Couto, minha eterna Mari-Moon e Nara Rubia Dalla Bernardina e nosso chaveirinho Leonardo Escouto (Léo), obrigado.

Silas Nascimento Ronchi, obrigado por dividir essa carga, juntos somos mais fortes, do meu jeito excêntrico tentei ser um bom parceiro na pós e na vida, da melhor forma possível, você é muito mais que o doutorando do projeto OXA, você é um amigo prezado.

Agradeço ainda a todos os colegas da pós-graduação pelos momentos de trabalho, estudo, diversão e apreensão, especialmente Bruno Jacobsen e Filipe Filetti.

Agradeço aos Professores Dr. Dalton Valentim Vassalo, Dr. José Geraldo Mill, Dr. Roger Lyrio dos Santos, Dr. Leonardo dos Santos e Dr. Jones Bernardes Gracelli, as Professoras Dra. Silvana Meyrelles, Dra. Suely Gomes Figueiredo, Dra. Sonia Alves Gouvea, Dra. Alessandra Simão Padilha, Dra. Ester Miyuki Nakamura-Palacios e Dra.

Lívia Carla de Melo Rodrigues por todo conhecimento ministrado e pela paixão pela arte.

Agradeço aos colegas do biotério, manutenção e em especial Luciene Bessoni, Viviane Meneguzzi e Rafaela Araújo que além de sempre perguntarem pelo andamento deste trabalho, perguntavam também por meu bem-estar e da minha família.

Aos mui amados Thavia Costa, Amanda Leonardo e Andrea Rosetti por cada demonstração de afeto que me ajudou a derivar força para continuar.

Aos amigos que de modo tão intenso me ajudaram a seguir em frente, com palavras, ações e ajuda profissional: Thiago Salazar, Vitor Itaboraí e Joyce Sarti, Maicon Dias e Juliana Oliveira, Marcelo Abelha, Leandro Minifred, Marcelo Della Fuente e Raquel Guizarde, Alexandre Marreco e Alice Comper (e o bebê que logo virá).

Agradeço à família Andrade pelo apoio tão significativo, em especial à Yasminne Danae, José Roberto, Rosania, Gabriel e Eduardo.

Agradeço ao Grêmio Recreativo Escola de Samba Pega No Samba, todas as alas, em especial a equipe de música, Fernando Brito, Breno Almeida, Jana Soares, Douglas Jacaré, Guilherme, Alex, Leozinho e Fabinho.

Agradeço ao município de Cariacica, cada cariaciquense, Trabalho com vocês há quase 8 anos. Obrigado Ricardo José, onde quer que esteja, Cynthia Bigossi por me ensinar a trabalhar, Dyeny e Evelyn por serem as melhores coordenadoras, Marcela Savergnini pelo coração sublime, Eder Pimentel pelo apoio e por ter sofrido por mim, Fernando Cesar pela companheirismo, Adolfo Mucci pelas músicas e conversas em italiano, pelo abraço e beijo matinal, hoje não sinto falta de pai porque tenho você, a toda a equipe da vigilância sanitária, pelo apoio e pelos desafios, olhem minha conquista e considerem nossa!

Ao FAPES pelo financiamento do projeto que originou esse trabalho.

Muito obrigado!!!!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS.....	17
1.2 OXANDROLONA	19
1.3 EFEITOS DOS EAA EM SISTEMAS QUE MODULAM O SISTEMA CARDIOVASCULAR	22
1.3.1 ERO x EAA	25
1.4 CONTRATILIDADE CARDÍACA.....	26
1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	29
2 OBJETIVO GERAL	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.2 AVALIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO.....	32
3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA.....	33
3.4 RETIRADA DOS TECIDOS.....	34
3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	34
3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	35
3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	36
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL INICIAL E FINAL.....	37
4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM OXA SOBRE O TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO.....	37
4.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO SISTÓLICA VENTRICULAR ESQUERDA E PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE	38
4.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	40
4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OXA SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSIENTE DE CÁLCIO (SERCA-2A, PLB e P-PLB e NCX) .	42
4.5.1 Avaliação da expressão proteica da serca-2a no ventrículo esquerdo.....	42
4.5.2. Expressão proteica da PLB no ventrículo esquerdo.....	43

4.5.3 Expressão proteica do NCX	44
4.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
4.7 ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSIVA - ECA	46
5 DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores dos pesos dos grupos CON e OXA.....	37
Tabela 2: Efeitos do tratamento com oxandrolona nos parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo e níveis de pressão arterial média, sistólica e frequência cardíaca.....	39
Tabela 3: Efeito do tratamento com oxandrolona sobre o peso do ventrículo esquerdo, comprimento da tíbia, razão do peso ventrículo esquerdo/comprimento da tíbia.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos hormônios esteroides.....	18
Figura 2: Similaridade estrutural entre a testosterona e OXA.....	19
Figura 3: Fases do desenvolvimento do rato wistar. D: dias de nascido.....	29
Figura 4: Resumo dos protocolos experimentais.....	32
Figura 5: Esquema resumido do protocolo de avaliação do tônus autonômico cardíaco.....	33
Figura 6: Análise morfológica e morfométrica dos VE para avaliação da hipertrofia.....	38
Figura 7: Efeitos do tratamento com OXA (oxandrolona) sobre a FC intrínseca dos ratos wista.....	38
Figura 8: Medida da Pressão ventricular sistólica esquerda dos grupos CON e OXA (oxandrolona).....	39
Figura 9: Análise morfométrica dos do ventrículo esquerdo (VE). Esquerda: lâminas Histológicas representativas do VE nos grupos Controle (CON) e oxandrolona (OXA).....	40
Figura 10: Análise morfométrica do VE dos grupos CON e OXA. Lâminas coradas com o método Hematoxilina/Eosina (H&E).....	41
Figura 11: Análise Histológica do coração dos grupos CON e OXA, lâminas de VE após coloração de Picrosírius Red.....	42
Figura 12: Expressão proteica da SERCA-2a em ventrículos esquerdos e razão com PLB de animais controle (CON) e oxandrolona (OXA).....	43

Figura 13: Expressão proteica da PLB no ventrículo esquerdo e razão p-PLB / PLB.....	44
Figura 14: Expressão proteica do NCX em ventrículos esquerdos.....	44
Figura 15: Análise dos componentes relacionados ao estresse oxidativo.....	45
Figura 16: Expressão proteica da ECA em ventrículos esquerdos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANG I	Angiotensina 1
ANG II	Angiotensina 2
AT1	Receptor De Angiotensina 1
AT2	Receptor De Angiotensina 2
BEI	Baixa Estatura Idiopática
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaMKII	Calmodulina
CON	Controle
COX	Cicloxigenase
CT	Comprimento Da Tíbia
DAG	Diacilglicerol
DECA	Decanoato de Nandrolona
EAA	Esteroides Anabólicos Androgênicos
ECA	Enzima Conversora De Angiotensina
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
FC	Frequência Cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
GH	Hormônio do Crescimento
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP3	Trifosfato de inositol
LOX	Lipoxigenase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOX	NADPH oxidase
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
OXA	Oxandrolona
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PKA	Proteína Quinase Dependente De Ampc
PLB	Fosfolambam
p-PLB	Fosfolambam fosforilado
PLC	Fosfolipase C
RS	Retículo Sarcoplasmático
SCV	Sistema Cardiovascular
SERCA-2a	Bomba De Ca ²⁺ Atpase
SRA	Sistema Renina Angiotensina
ST	Síndrome de Turner
TNFR1	Receptor 1 de TNF-α
TNFR2	Receptor 2 de TNF-α
TNF-α	Fator De Necrose Tumoral
VE	Ventrículo Esquerdo
VE/CT Tíbia	Razão Do Peso Do Ventrículo Esquerdo Pelo Comprimento Da Tíbia
XO	Xantina oxidase

RESUMO

A oxandrolona é um esteroide anabólico androgênico utilizado na prática clínica para tratamento de queimaduras graves, traumatismo após cirurgia de grande porte, perda muscular relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), distúrbios neuromusculares, angioedema hereditário, e hepatite alcoólica. É empregada no tratamento de pacientes juvenis que apresentam Baixa Estatura Idiopática e também problemas no crescimento devido a doenças raras de etiologia genética. Diversos estudos demonstram que o uso de drogas durante a infância e adolescência pode impactar negativamente na fase adulta destes indivíduos. Este trabalho objetiva avaliar os efeitos do tratamento com oxandrolona, na dose similar à terapêutica, sobre a contratilidade cardíaca em ratos pré-púberes. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: CON (controle) e OXA (tratados com oxandrolona 2,5mg/kg/dia durante quatro semanas). Os parâmetros hemodinâmicos (+dP/dt_{máx}, -dP/dt_{min} e Tau) foram avaliados no ventrículo esquerdo. O coração foi coletado para análise histológica (H&E) e deposição de colágeno (picrossírius red). A análise da expressão das proteínas relacionadas com o transiente de Ca²⁺ citosólico (SERCA-2a e fosfolambam), e as enzimas relacionadas ao sistema antioxidante (SOD1 e catalase) foi realizada por Western blot. Os animais tratados com OXA não apresentaram alteração da contratilidade e relaxamento cardíaco, embora apresentaram aumento da pressão sistólica ventricular esquerda, não caracterizando, porém, uma condição hipertensiva. Além disso, a OXA promoveu aumento na expressão da SERCA-2a, fosfolambam fosforilada, bem como da razão SERCA-2a/fosfolambam, enquanto a expressão do trocador de Na⁺/Ca²⁺ (NCX) não foi alterada pelo tratamento. Portanto, o tratamento com OXA, por quatro semanas, em ratos pré-púberes foi capaz de promover hipertrofia cardíaca, mas não alterou a função cardíaca, nem as proteínas responsáveis pela mobilidade do Ca²⁺ citosólico, todavia, a hipertrofia cardíaca observada, em virtude da deposição de colágeno, é patológica. Em conclusão, a OXA parece não alterar a função cardíaca embora promova alterações estruturais e moleculares.

Palavras-chave: Oxandrolona; contratilidade cardíaca; ratos pré-púberes, proteínas de mobilidade de Cálcio; interrupção do controle redox; sistema renina angiotensina.

ABSTRACT

Oxandrolone is an androgenic anabolic steroid used in clinical practice for the treatment of severe burns, trauma after major surgery, muscle loss related to acquired immune deficiency syndrome (AIDS), neuromuscular disorders, hereditary angioedema, and alcoholic hepatitis. It is used in the treatment of juvenile patients with idiopathic short stature and also growth problems due to rare diseases of genetic etiology. Several studies have shown that drug use during childhood and adolescence may negatively impact the adult phase of these individuals. This study aims to evaluate the effects of oxandrolone on cardiac contractility in prepubertal rats. The animals were distributed randomly into two groups: CON (control) and OXA (treated with oxandrolone 2.5mg / kg / day for four weeks). The hemodynamic parameters (+dP / dt max, -dP / dt min and Tau) were evaluated in the left ventricle. The heart was collected for histological analysis (H & E) and deposition of collagen (picrosirius red). The analysis of the expression of proteins related to the transient cytosolic Ca²⁺ (SERCA-2a and phospholamban), and the enzymes related to the antioxidant system (SOD1 and catalase) was performed by Western blot. The animals treated with OXA showed no increase in cardiac contractility and relaxation, although they showed an increase in left ventricular systolic pressure, but not characterizing a hypertensive condition. In addition, OXA promoted increased expression of SERCA-2a, phosphorylated phospholamban as well as the SERCA-2a / phospholamban ratio, while Na⁺ / Ca²⁺ (NCX) exchanger expression was not altered by treatment. Therefore, treatment with OXA for four weeks in prepubertal rats was able to promote cardiac hypertrophy but did not alter the cardiac function nor the proteins responsible for calcium handling, but the observed cardiac hypertrophy due to collagen deposition, is pathological. In conclusion, OXA does not appear to alter cardiac function, although it promotes structural and molecular changes.

Keywords: Oxandrolone; prepubescent rats; cardiac contractility; calcium handling; disruption of redox control; renin angiotensin system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino, sintetizado nos testículos e em menor quantidade, pelo córtex da suprarrenal (Liu et al., 2003). A fim de se tratar doenças relacionadas a deficiência deste hormônio, modificações estruturais visando aumentar a potência anabólica e reduzir a androgênica foram realizadas na molécula de testosterona, dando origem aos esteroides anabólicos androgênicos (EAA). São moléculas sintetizadas a partir da testosterona por meio de alterações estruturais (Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

Os EAA, pelo seu caráter lipofílico atravessam a membrana celular (Hall e Hall, 2005), podem atuar por duas vias, a saber, a via clássica, também conhecida como via genômica e a via não clássica, conhecida como não-genômica (figura 1). Na via genômica os EAA se difundem através da membrana plasmática e no citoplasma se ligam à receptores androgênicos intracelulares formando complexos com tais receptores, assim são transportados para o núcleo, onde se ligam ao DNA, em uma região chamada elementos responsivos atuando como fatores de transcrição de elementos específicos do DNA, promovendo conseqüentemente uma resposta androgênica e/ou anabólica (Shahidi, 2001).

Na via não-genômica, os EAA atuam sobre receptores de membrana, do tipo metabotrópicos, ativando assim a proteína G e conseqüentemente, uma cascata de segundos mensageiros, logo esta via apresenta ação mais rápida, onde os sinais são traduzidos em alterações nas funções celulares em segundos a minutos (Falkenstein et al., 2000; Kousteni et al., 2001). No estudo de Denq et al (2014), foi observado que a ação não-genômica da testosterona nos receptores de androgenicos (RA) localizados na membrana plasmática foi mediada por fosforilação rápida das vias quinase ativadora da MAP quinase (MEK) e da Proteína Quinase B (Akt), e também por ativação da tirosina quinase.

Dessa forma, a testosterona bem como seus análogos podem agir pelos receptores androgênicos nucleares ou por via não genômica, em diversos tecidos, como o coração, sistema reprodutor, sistema nervoso central, os músculos, fígado, rim (Wilson, 1988; Shahidi, 2001).

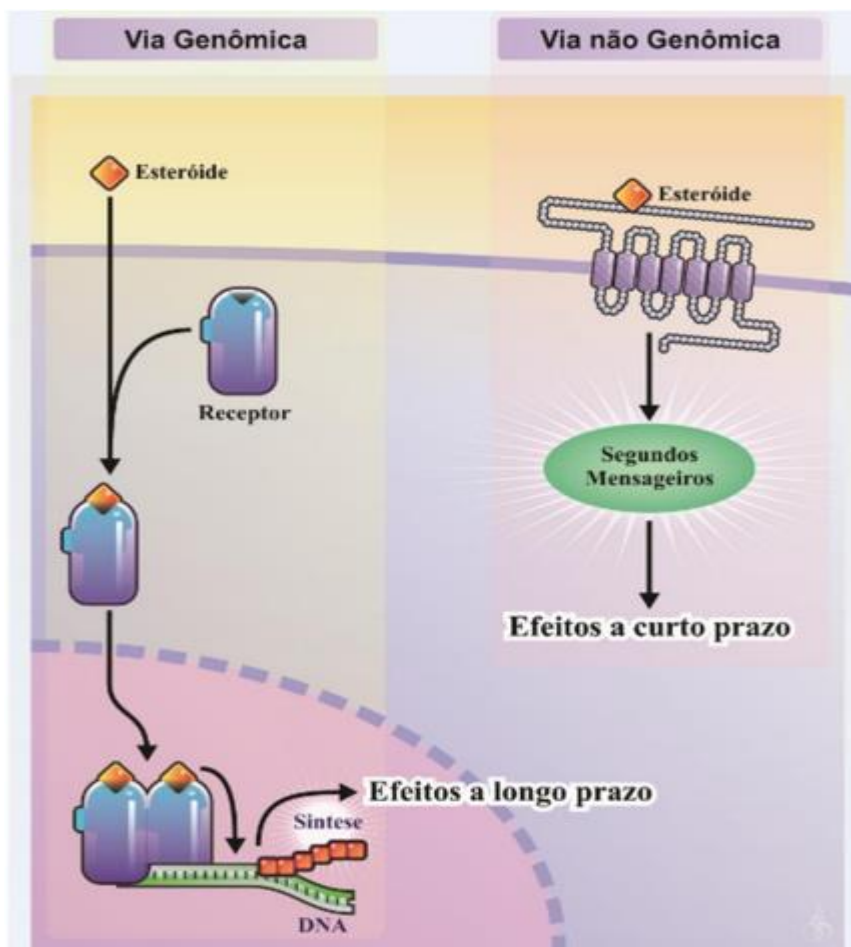


Figura 1: Mecanismo de ação dos hormônios esteroides.

Fonte: Brasil, 2016.

São inúmeros os trabalhos que relatam os efeitos deletérios da administração de doses abusivas de EAA como decanoato de nandrolona (DECA) e propionato de testosterona sobre o sistema cardiovascular (SCV). Dentre estes prejuízos, pode ser citado a hipertrofia e a deposição de colágeno, caracterizando o remodelamento cardíaco (Hockman e Buckey, 1982; Bissoli et al., 2009; Tanno et al., 2011; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013; Lima et al., 2015; Nascimento et al., 2016; Seara et al., 2017), aterosclerose, vasoespasma, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, cardiomiopatia, morte súbita, bem como disautonomia cardíaca (El-Mas et al., 2001; Andrade et al., 2008; Bissoli et al., 2009; Nascimento e Medei, 2011; Turillazzi et al., 2011; Maior et al., 2013; Olivares et al., 2014). Neste estudo, avaliamos os efeitos da oxandrolona, por este motivo detalharemos sua estrutura, efeitos fisiológicos, farmacológicos e usos clínicos.

1.2 OXANDROLONA

A Oxandrolona (OXA) foi sintetizada pela primeira vez por Pappo e Jung em 1962 (Pappo; Jung, 1962) e comercializada com o nome Anavar em 1964. A Oxandrolona (OXA; 17 β -Hydroxy-17-methyl-2-oxa-5-androstan-3-ona) é um análogo da testosterona, um esteroide 17 β -alquilado que possui potente atividade anabólica e baixa atividade androgênica (Figura 2) (Demling; Orgill, 2000; Orr; Singh, 2004). O anel A do núcleo esteroide e a alquilação no carbono C17 conferem a OXA a capacidade de absorção oral, sua metabolização hepática resulta na formação do 17-epioxandrolona a partir de reações de sulfatação (Akyurek; Dunn, 2006). Uma vez biotransformado pode sofrer ação das enzimas de Fase 2, sendo principalmente a glicuronidação dos compostos a mais comum (Kuhn, 2002; Schanzer, 1998). Além disso, a OXA possui como outras características, a alta ligação as proteínas plasmáticas (95%) e a baixa taxa de biotransformação hepática, cerca de 28% da droga é excretada na forma inalterada na urina, resulta em níveis plasmáticos mais altos da OXA quando comparada a outros EAA (Akyurek; Dunn, 2006; Wilson 1988).

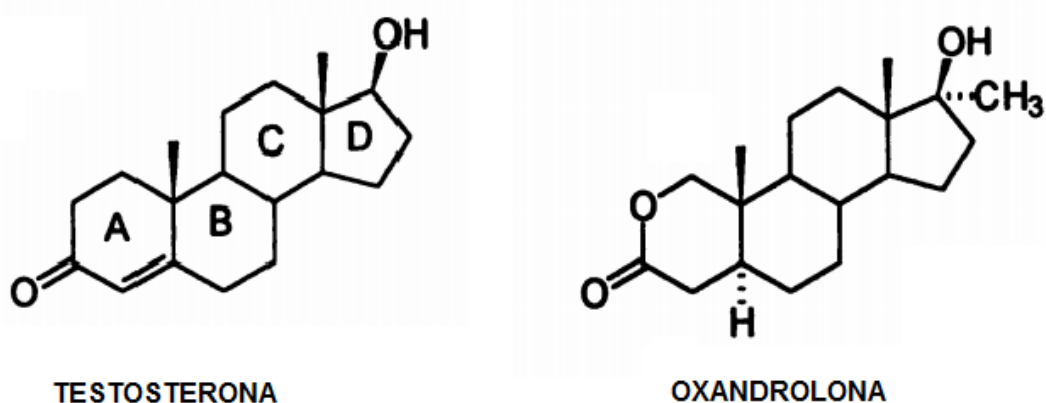


Figura 2. Similaridade estrutural entre a testosterona e OXA

Fonte: Adaptado de Schanzer, 1996.

De acordo com Akyurek e Dunn (2006), a OXA é utilizada clinicamente no tratamento de diversas doenças tratáveis por meio de EAA, tais como queimaduras graves, traumatismo após cirurgia de grande porte, perda muscular relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), distúrbios neuromusculares, angioedema

hereditário, e hepatite alcoólica. É digno de nota que a OXA é o único EAA aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de perda de peso, grandes cirurgias ou infecções, desnutrição relacionada à cirrose alcoólica e doenças neuromusculares. Adicionalmente, OXA é empregada no tratamento de pacientes juvenis que apresentem Baixa Estatura Idiopática (BEI) e também problemas no crescimento devido a doenças raras, como a Síndrome de Turner (ST) (Pappo; Jung, 1967; Moore, 1976).

A ST é uma doença genética associada à falta parcial ou total do cromossomo X, conferindo ao paciente um cariótipo com 45 cromossomos (45X) ao invés de 46 (Abramowitz; Stichelene; Hanover, 2014; Ross et al., 2009). As características anatômicas próprias dessa doença foram descritas primeiramente por um anatomista italiano Giovanni Morgagni em 1768 (Jung et al., 2009), e anos depois, em 1938, foi detalhada por Turner e por isso a síndrome foi batizada com seu nome (Turner, 1938).

A estimativa é que a cada 3000 nascidos vivos, 1 é portadora da ST, esta condição genética é responsável por abortos espontâneos nos primeiros três meses de gestação (WHO, 2016). A ST atribui às portadoras características físicas como pescoço alado e segundo Loscalzo et al (2005), existe forte relação entre pescoço alado e coarctação da aorta, em virtude de malformações congênitas. Corroborado por Saenger (2008), que mostrou que das malformações cardiovasculares congênitas apresentam prevalência de 55% e as doenças renovasculares apresentam prevalência de 39%, na ST. Desse modo, na ST alta taxa de morbidade e mortalidade ocorre em virtude destas doenças (Nathwani et al., 2000; Orbañanos et al., 2015).

Adicionalmente, malformações e estigmas óticos, em virtude de anomalias congênitas, tratamento ou à falta dele, muitas vezes são subestimados, tais como ambliopia, estrabismo, epicanto, hipermetropia e daltonismo e hipertelorismo (Denniston, 2001).

O tratamento comumente é feito com administração do hormônio do crescimento (GH), embora não existam evidências da deficiência da secreção de GH na ST, contudo tal tratamento é indicado em condição de baixa estatura (Bondy, 2007). É intrínseco à ST que suas portadoras apresentem hipogonadismo primário, deste modo, emprega-se também baixa dose de estrogênio concomitantemente ao tratamento com GH (Rosenfield et al., 2005). Adicionalmente, é empregada a OXA para melhorar o crescimento (Sas et al., 2014; Orbañanos et al., 2015;).

Menke et al (2010) demonstraram que a dose recomendada para o tratamento da ST está entre 0,03mg/kg/dia até 0,06mg/kg/dia, onde a dose baixa (0,03mg/kg/dia) aumenta modestamente o ganho de peso e a dose alta (0,06mg/kg/dia) não altera significativamente o ganho de estatura. É digno de nota que o período de tratamento é variante e que em virtude deste, alguns efeitos adversos podem ser observados, sendo esse o principal motivo de suspensão do tratamento (Sas, 2014).

A OXA também é utilizada no tratamento de BEI, segundo Bryant et al (2007) a BEI é uma condição na qual a altura dos indivíduos se encontra abaixo de menos dois desvios-padrão (DP) ou abaixo do percentil 3 da altura média para a idade, sexo e grupo populacional, na qual não foi identificada nenhuma doença.

Segundo Boonstra (2006) cerca 3% das crianças tem tamanho inferior a idade, logo quando nascem, e em 10% destas, esta diferença é mantida por toda a fase infantil e em alguns casos na fase adulta.

Aproximadamente 80% dos infantes com estatura igual ou inferior a 2 DP são diagnosticadas com BEI. É difícil de estimar precisamente incidência e a prevalência da BEI tendo em vista que a BEI é uma condição complexa e dependente de diversos fatores, desse modo não se pode utilizar critérios diagnósticos. Observa-se maior prevalência em meninos, independentemente da classe social (Cohen et al; 2008)

Há indicações do uso de OXA em crianças, especialmente do sexo masculino, com baixa estatura idiopática, por este EAA apresentar baixo efeito androgênico. Nesses casos a indicação é o tratamento para crianças com mais de 9 anos por um período máximo de 1 ano, sendo a dose indicada de 2,5 – 5 mg/dia (Ranke, 2013).

Adicionalmente, o período de tratamento é considerado em virtudes de efeitos colaterais que podem surgir. Raros são os efeitos adversos do tratamento com OXA, todavia, foram relatados efeitos colaterais semelhantes aos dos outros EAA, como engrossamento da voz, clitoromegalia, crescimento de pelos faciais, alopecia, acne, aumento da libido e alterações no ciclo estral. Portanto, esses efeitos adversos parecem depender da relação temporal de uso (Boris et al., 1972; Akyurek; Dunn, 2006; Ranke, 2013)

Embora não existam relatos publicados sobre os efeitos do tratamento terapêutico com OXA no SCV, a alta prevalência de malformação cardíaca na ST (Saenger, 2008) e a alta morbidade e mortalidade por elas (Nathwani et al., 2000), associadas aos

resultados dos estudos sobre o uso abusivo de outros EAA destacam a relevância deste trabalho. Estudos do nosso grupo (Bissoli et al., 2009; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013; Lima et al., 2015; Nascimento et al., 2016; Melo Junior et al., 2018) e de outros grupos (Fanton et al., 2009; Medei et al., 2010; Neves et al., 2013; Seara et al., 2017) que demonstraram a influência de altas doses dos EAA levando a efeitos deletérios no SCV, abaixo mostramos os principais efeitos dos EAA em sistemas importantes que modulam o SCV.

1.3 EFEITOS DOS EAA EM SISTEMAS QUE MODULAM O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Um importante sistema, no qual os EAA atuam para alterar o SCV é o sistema renina angiotensina (SRA). Esse sistema tem importante atuação na regulação da pressão arterial (PA), equilíbrio hidroeletrolítico, estrutura e função cardiovascular e essas ações são principalmente mediadas pela ação da Angiotensina II (ANG II) (Johnston, 1992).

A formação da ANG II envolve a clivagem sequencial do angiotensinogênio promovida pela enzima renina, liberada principalmente pelas células justaglomerulares do rim, quando há detecção da redução do fluxo sanguíneo nas arteríolas aferentes glomerulares (Vallotton, 1987). O angiotensinogênio é clivado no decapeptídeo Angiotensina I (ANG I), que, por sua vez é hidrolisado no octapeptídeo ativo ANGII, pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

Os efeitos fisiológicos da ANG II são mediados pela ligação da mesma a receptores específicos localizados na membrana celular (Timmermans et al., 1993). Duas isoformas principais de receptores para a ANG II são conhecidas e amplamente expressos: AT1 e AT2, sendo que a maioria dos seus efeitos deletérios, como aumento da resistência vascular periférica e proliferação celular, são mediadas pela ativação de receptores do subtipo AT1 (Gasparo et al., 2000; Timmermans et al., 1993). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G. Conseqüentemente, a estimulação de AT1 ativa a fosfolipase C (PLC), que por sua vez, aumenta os níveis de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3) no citosol. Essa ativação promove o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular e promove ativação de várias quinases modulando as funções celulares (Chiu et al., 1989; Paxton et al., 1993).

No cardiomiócito, estas respostas alteram o meio eletrofisiológico determinando crescimento e proliferação celular, promovendo a hipertrofia tanto por meio indireto (sobrecarga devido ao aumento da pressão) quanto diretamente via AT1. Este estímulo induz a síntese de fatores de crescimento e genes que regulam o crescimento e proliferação celular (Oigman, Neves, 2000; Leifheit-Nestler et al., 2018)

Considerado como um sistema constitutivo de ação parácrina e autócrina, o SRA e seus constituintes, como a renina, o angiotensinogênio, a ECA e os receptores AT1 e AT2 tem sido amplamente estudados no miocárdio, a detecção de RNAm para os seus componentes neste tecido, fornece apoio para a geração local de ANG II cardíaca (Paul; Mehr; Kreutz, 2006; Wollert; Drexler, 1999).

Dessa forma, sugere-se que a ANG II exerce efeito hipertrófico nos cardiomiócitos, estimulando a proliferação de fibroblastos, que por sua vez sintetizam colágeno, que é um dos constituintes da matriz extracelular (MEC). A ANG II pode levar ao acúmulo de proteínas na MEC (Sadoshima; Izumo, 1993). Adicionalmente, sabe-se que a síntese da ANG II não seria decorrente da via clássica do SRA plasmático, mas também da síntese local deste peptídeo pelos componentes desse sistema, resultando na modulação da função cardíaca (Mentz et al., 2013).

O crescimento dos miócitos cardíacos, juntamente com a deposição de colágeno configuram o remodelamento cardíaco (Sadoshima; Izumo, 1993). Neste processo ocorre o aumento do volume dos miócitos em consequência de aumento no diâmetro celular devido a novos sarcômeros em paralelo ou na perpendicular aos já existentes, associado a deposição de colágeno na matriz celular (Cohn; Ferrari; Sharpe, 2000). Esse fenômeno pode ser atribuído à ação da ANG II, como foi demonstrado em cultura de células de fibroblastos, que promove acúmulo de colágeno, devido a alterações na síntese e a degradação do mesmo (Weber; Brilla; Janicki, 1991). Adicionalmente, este peptídeo participa na reparação e remodelação do tecido, por meio da regulação do crescimento celular, podendo promovendo hipertrofia (Suzuki et al., 2003). Desse modo, o remodelamento, com deposição de colágeno do tipo I, que é o maior constituinte do colágeno cardíaco, indica a presença de hipertrofia patológica (Sasayama; Matsumori; Kihara, 1999; Mill; Vassalo, 2001; Shen; O'Brien; Xu, 2006).

Adicionalmente, a hipertrofia cardíaca pode ser uma resposta adaptativa à sobrecarga funcional imposta ao coração (sobrecarga de trabalho), e em algumas situações pode levar ao aumento da deposição de colágeno no interstício. Resultando na formação

de fibras colágenas fortemente ligadas quimicamente e resistentes à degradação enzimática (Zornoff et al., 2009; Bhatt; Velasquez, 2017).

Metaloproteinases de matriz (MPM) são protoenzimas colagenolíticas latentes que podem ser ativadas por ação da ANG II, catecolaminas, citocinas (TNF- α , Interleucina 1), estímulos mecânicos, entre outros fatores (Zornoff et al., 2009). A degradação do colágeno pelas MPM é impedida por ação dos inibidores teciduais das MPM, que apresentam quatro isoformas, TIMP-1, TIMP -2, TIMP -3 e TIMP -4 (Visse; Nagase, 2003). Tais inibidores são proteínas de baixo peso molecular que formam complexos com os MPM bloqueando seus sítios catalíticos, promovendo acúmulo de colágeno na MEC, que pode causar fibrose e conseqüentemente aumento da rigidez da parede do miocárdio, interferindo na contratilidade cardíaca (Volders et al., 1993; Matsubara et al., 2000; St John Sutton, 2000; Sharpe, 2000; Janicki; Brower, 2002; Richardson et al., 2015).

Com a diminuição da atividade das enzimas colagenolíticas, a degradação do colágeno é diminuída (Weber, 2000), bem como a potencialização dos fatores pró-fibróticos (como o fator de crescimento transformador β - TGF- β), podendo ocorrer fibrose (Feuerstein; Weck, 1999).

Em estudo recente, Leifheit-Nestler (2018) concluiu que o SRA age sinergicamente com o Fator de Crescimento Fibroblástico 23 (FGF23) promovendo hipertrofia do ventrículo esquerdo e fibrose, em pacientes saudáveis e com doenças renais. Desta forma, está bem estabelecido o papel do SRA na hipertrofia cardíaca, visto que em virtude da ativação do SRA e resultante ação deletéria da ANG II pode ocorrer indução de fibrose cardíaca e proliferação celular, efeitos estes, vinculados ao aumento da produção de fatores pró-fibróticos, como as citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e TGF- β (Ferrario; Strawn, 2006; Andrzejczak; Górska; Czarnecka, 2007; Leask, 2010; Carmo et al., 2011).

A ação da ANG II sobre o receptor AT1, promove aumento da ativação da NADPH oxidase (NOX), principal responsável pela produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Sampaio; Santos, 2004). Adicionalmente, por ação das enzimas xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LOX), cicloxigenase (COX), os fibroblastos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO). Os fibroblastos também podem produzir espécies reativas de nitrogênio (ERN), por ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

Desse modo a ANG II estimula a atividade da enzima NOX, aumentando a liberação de $O_2^{\cdot-}$, que é a molécula de maior destaque dentre as ERO na fisiopatologia cardiovascular (Halliwell; Gutteridge, 1990; Griending et al., 2000; Viridis et al., 2011).

Foi observado em estudos com altas doses de EAA, aumento da atividade da ECA e por sua vez, conseqüente ativação do SRA (Rocha et al., 2004; Carmo et al., 2011; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013). Esses resultados foram confirmados pelo estudo de Marques Neto et al (2014) que sugeriram a relação do SRA na modulação dos efeitos deletérios do EAA, uma vez que a administração de losartana (bloqueador do receptor AT1) e espironolactona (bloqueador do receptor mineralocorticoide) concomitante ao tratamento com EAA, preveniram distúrbios na função parassimpática e a repolarização ventricular.

No estudo de Melo Junior et al (2018), em ratos SHR, observaram a influência do SRA sobre os efeitos deletérios do abuso de DECA à medida que o tratamento com Enalapril (inibidor da ECA) reduziu a PAS e manteve os índices de hipertrofia cardíaca, parâmetros de contratilidade e relaxamento cardíaco, e as proteínas envolvidas na mobilidade do Ca^{2+} intracelular aos níveis dos animais controle. Adicionalmente, Lima et al (2015) inferiram a participação do SRA no aumento da produção de citocinas inflamatórias e que ambos estes sistemas, participam do remodelamento cardíaco causado por EAA.

1.3.1 ERO x EAA

As ERO são átomos ou moléculas altamente reativas, oriundos de reações químicas com participação do oxigênio, tais entidades químicas são extremamente instáveis e reativas devido a seu número de elétrons na camada de valência (Halliwell; Gutteridge, 1990).

A formação de ERO podem ocorrer em nosso organismo, de modo natural, fisiológico, mas também de modo fisiopatológico, logo, a produção de ERO se dá como um processo comum aos organismos aeróbicos. Sendo assim, o estresse oxidativo é caracterizado pela ocorrência de injúrias a diferentes estruturas celulares, em virtude do desequilíbrio a favor da produção de ERO (Emerit et al., 2001; Barreiros; David, 2006). A principal fonte de formação de ERO na célula é a mitocôndria. Altos níveis de ERO promovem aumento de resistência das artérias, ao passo que diminuem a concentração de óxido nítrico (NO) biodisponível por meio da peroxidação de lipídeos

de membrana, prejudicando o relaxamento vascular (Harrinson; Gongora, 2009, Klima et al., 2013).

O organismo possui mecanismos antioxidantes naturais, responsáveis por inibir a formação ou eliminar as ERO. Uma substância antioxidante então, previne a oxidação do substrato ou o reestrutura. Dentre os mecanismos antioxidantes, na defesa antioxidante endógena, as enzimas glutaciona-peroxidase, catalase e superóxido-dismutase (SOD) se destacam (Halliwell, 1987; Halliwell et al., 2000). As enzimas glutaciona peroxidase e catalase degradam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Contudo, a glutaciona peroxidase utiliza o H_2O_2 para formar glutaciona oxidada a partir da glutaciona reduzida. A função da catalase então é decompor o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo a SOD a enzima antioxidante mais abundante no organismo humano, configura-se uma importante defesa contra o estresse oxidativo. Adicionalmente a SOD possui diferentes cofatores como zinco, manganês, cobre, ferro ou níquel, de acordo com a espécie (Halliwell; Gutteridge, 1986).

Estudos anteriores com doses abusivas de EAA mostraram efeito redutor das enzimas antioxidantes, e indução de estresse oxidativo em tecido hepático de ratos (Chaves et al., 2005; Pey et al., 2003). Por outro lado, Celec et al (2003), observaram que doses similares à terapêutica de testosterona e DECA foram capazes de proteger parcialmente o tecido hepático e cerebelar de lesão induzida por etanol mediada pelo estresse oxidativo. Em estudo recente de nosso grupo Caliman et al, (2017) demonstraram ocorrer redução da produção de óxido nítrico via enzima óxido nítrico sintase em ratas wistar tratadas com doses supra fisiológicas de DECA.

1.4 CONTRATILIDADE CARDÍACA E TONUS AUTONÔMICO

Foi de interesse estudarmos nos grupos experimentais a contratilidade cardíaca e o tônus autonômico, uma vez que, é conhecido que as alterações induzidas por EAA afetam esses parâmetros (Pereira Junior et al., 2006; Tanno et al., 2011; Marques et al., 2016, Nascimento et al., 2016; Melo Junior et al., 2018).

Em relação a contratilidade, é bem conhecido que o sarcômero é a menor unidade funcional de contração dos cardiomiócitos, constituídas por miofibrilas formadas por proteínas contráteis, estruturais e regulatórias. As proteínas contráteis, ou miofilamentos grossos constituintes do sarcômero são formadas pela miosina e os

filamentos finos, formados por actina, troponina I, troponina T, troponina C e alfa-tropomiosina (Katz, 1970; Kobayashi; Brette; Orchard, 2003; Maughan, 2005).

O processo de acoplamento excitação-contração ocorre pela interação dos sítios ativos da actina com a miosina, promovendo um encurtamento dos sarcômeros e conseqüentemente do músculo cardíaco, resultando na contração propriamente dita, resultado final de uma sequência de eventos gerados pelo potencial de ação cardíaco (Lizardo, 2008). A contração muscular se dá pela ligação do Ca^{2+} à troponina C nos filamentos de actina, o que confere estabilidade a ligação da Troponina C com Troponina I, alterando a conformação espacial da Tropomiosina, removendo o bloqueio do sítio de ligação da miosina. Desse modo, formam-se as pontes cruzadas de actina-miosina, resultando na contração muscular (Huxley; Hanson, 1954; Dobesh; Konhilas; Tombe, 2002; Moss et al., 2004).

Para que ocorra o relaxamento, a concentração de Ca^{2+} no citosol deve ser reduzida, um dos meios pelo qual esta redução pode ser promovida é pela retirada do Ca^{2+} do citosol para o espaço intersticial, o transportador mais importante neste caso é o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) uma proteína transportadora localizada na membrana celular responsável pela extrusão do Ca^{2+} citosólico (Katz, 1992; Dipolo; Beaugé, 2006). Ou ainda, a redução da concentração de Ca^{2+} pode se dar pela recaptação do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (RS) por meio de uma proteína transmembrana, chamada SERCA-2a, ela recapta o Ca^{2+} e o armazena no seu interior (Bassani; Bassani; Bers, 1994).

A atividade da SERCA-2a é modulada por uma proteína agregada a própria SERCA2a, denominada fosfolambam (PLB). A PLB não fosforilada inibe a recaptação do Ca^{2+} por diminuir a afinidade deste íon com a SERCA2a, quando fosforilada a PLB se dissocia da SERCA-2a e deixa de inibi-la, desse modo o Ca^{2+} é recaptado para o interior do RS resultando no relaxamento da fibra (Frank et al., 2003; Periasamy; Bhupathy; Babu, 2008).

Em estudos do nosso grupo, Nascimento et al (2016) analisando a contratilidade cardíaca em ratas normotensas, tratadas com DECA, com e sem exercício de resistência, observaram hipertrofia cardíaca, aumento da contratilidade cardíaca, provavelmente por alterar a expressão das proteínas envolvidas na mobilidade de Ca^{2+} . Adicionalmente, Melo Junior et al (2018) encontraram resultados similares ao trabalhar com ratos SHR tratados com DECA. Entretanto, no trabalho de Rocha et al

(2007), observaram que ratos wistar, submetidos ou não à treinamento físico e tratados com DECA, não mostraram alteração na contratilidade cardíaca.

Entre os fatores que podem afetar a contratilidade cardíaca podemos destacar o tônus autonômico. O controle autonômico do sistema cardiovascular se dá por meio do sistema nervoso parassimpático e simpático conferindo condições ideais de perfusão aos órgãos (Vasquez, 1994). São liberadas no coração, acetilcolina e noradrenalina, alterando o débito cardíaco por modular a frequência cardíaca (FC) e a força de contração das fibras do miocárdio. A ação da noradrenalina nos vasos de resistência promove alteração da resistência vascular periférica (RVP) (Silva, 2010). Desse modo, o sistema simpático tem função excitatória no coração e vasos sanguíneos, enquanto a inervação vagal tem função inibidora sobre o nodo sinusal e músculo cardíaco (Vasquez, 1994).

O controle do componente tônico, assim como a variação do componente fásico são dependentes de mecanismos que promovem ajustes da frequência e contratilidade cardíaca e dos vasos (Mengal, 2012). Sendo assim, três arcos reflexos estão envolvidos na modulação da atividade simpática e parassimpática, ou seja, na modulação autonômica cardiovascular. Estes reflexos percebem e ajustam as alterações na pressão arterial sanguínea (PA), no reflexo barorreceptor responsável pela manutenção da PA momento a momento, os barorreceptores, sensores sensíveis às deformações do vaso, regulam o controle reflexo autonômico e também os tônus simpático e parassimpático. No reflexo cardiopulmonar, os receptores cardiopulmonares detectam a variação do volume de sangue por meio da alteração da pressão dos ventrículos, resultando na modulação de respostas na FC.

No quimiorreflexo, os quimiorreceptores arteriais percebem variações plasmáticas da pressão parcial de CO₂, O₂ e pH, controlando assim a respiração e a circulação ajustando a ventilação e em seguida aumentando a FC e a PA por meio da ativação simpática (Vasquez et al., 1994; Angelis; Santos; Irigoyen, 2004; Braga et al., 2008).

Os EAA promovem alterações no controle reflexo do sistema cardiovascular. Em um estudo com wistar machos, El-Mas et al (2001) demonstraram que estes animais adultos castrados apresentaram prejuízo na sensibilidade do barorreflexo arterial, contudo, após reposição hormonal em dose semelhante a fisiológica, o prejuízo foi revertido. Beutel et al (2005) após tratamento com doses abusivas de estanazolol, avaliaram a sensibilidade do barorreflexo de ratos, mostrando um prejuízo do reflexo

após oito semanas de tratamento (Beutel; Bergamaschi; Campos, 2005). Embora Andrade et al (2008) não observaram prejuízo na sensibilidade do reflexo Besold-Jareh (RBJ) em animais tratados com 10mg por 4 semanas, Bissoli et al (2009), dobrando o tempo de tratamento com a mesma dosagem de DECA, observaram prejuízo do RBJ. Desse modo, estudos revelam uma relação dose, tempo e tipo de EAA dependente (Ward; Abdel-Rahman 2005; Ward; Abdel-Rahman, 2006; Pereira-Junior et al., 2006). Essas alterações podem refletir no tônus autonômico (El-Mas et al., 2001; Beutel; Bergamaschi. Campos, 2005)

1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando que as pacientes diagnosticadas com a ST apresentem alta morbidade e mortalidade, em virtude de doença cardiovascular (Nathwani et al., 2000; Orbañanos et al., 2015), e que não está claro se o uso de OXA por infantes de ambos os sexos com BEI pode afetar a função do coração, faz-se necessário, estudos sobre os impactos do tratamento com OXA durante a fase juvenil poderiam influenciar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na fase adulta.

Atualmente alguns estudos relataram efeitos deletérios no SCV de animais tratados com doses abusivas de EAA (propionato de testosterona e DECA) durante a adolescência (Olivares et al., 2014; Seara et al., 2017; Sretenovic et al., 2018), contudo, não há na literatura pesquisa acerca dos possíveis impactos na fase adulta, decorrentes do tratamento com dose terapêutica de OXA iniciado na fase juvenil. Nossa hipótese é que a administração de OXA, em dose terapêutica, durante a adolescência (figura 3) de ratos machos, possa não causar grandes alterações moleculares, estruturais e funcionais cardíacas e possivelmente não alterar o controle autonômico e a contratilidade cardíaca na fase adulta, uma vez que em nosso estudo, iniciamos o tratamento no animal com 30 dias de idade e finalizamos com 60 dias, desta forma confirmando a segurança terapêutica desta droga.

D30 - Pré-puberdade

D40 - Puberdade

D60 - Vida Adulta

Figura 3: Fases do desenvolvimento do rato wistar. D: dias de nascido.

Fonte: Adaptado de Olivares, 2014 e Seara, 2017.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com OXA na dose similar à terapêutica, nos parâmetros cardíacos de ratos, tratados durante a pré-puberdade e a puberdade (tratamento iniciado aos 30 dias de idade, tratados por 4 semanas)

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar ao final do tratamento os efeitos do tratamento com OXA no(a):

- Pressão sistólica e Frequência cardíaca;
- Tônus autonômico;
- Contratilidade cardíaca;
- Variação do peso corporal em relação à tíbia;
- Remodelamento Cardíaco;
- Componente do Sistema Renina Angiotensina: expressão proteica da ECA;
- Proteínas envolvidas com a mobilidade do cálcio e sistema antioxidante no coração: Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Serca-2a, fosfolambam e fosfolambam fosforilada, SOD1 e catalase;
- Peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no coração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais adotados obedeceram às normas estabelecidas pela comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) aprovados sob o nº10-2016. Foram utilizados ratos wistar machos, com peso inicial entre 80g e 90g, provenientes do Biotério da UFES. Esses animais foram mantidos em ambiente, temperatura (20-24°C) e luz controlados. Ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água e comida de modo irrestrito.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 2 grupos experimentais, sendo:

1. Controle (CON): Animais tratados com veículo (Carboximetilcelulose; 0,1 mL, diariamente - 4 semanas via gavagem).
2. Oxandrolona (OXA): Animais tratados com Oxandrolona (Manipula, farmácia de manipulação, Cariacica, ES, Brasil).

Para o cálculo da dose, utilizamos a dose diária humana de 5mg de OXA (Menke et al, 2010). Considerando peso humano (criança) 20kg (Reagan-Saw et al, 2007) temos dose equivalente humana (HED): $5\text{mg} / 20\text{Kg} = 0,25 \text{ mg} / \text{kg}$.

Como método translacional, calculamos a dose para o rato com base na área de superfície corporal e utilizando o fator Km como normalizador na extrapolação da dose (Reagan-Saw et al, 2007):

$\text{HED (mg / kg)} = \text{dose animal (mg / kg)} \times (\text{Km animal} / \text{Km humano})$; então:

$0,25 = \text{dose animal (mg / kg)} \times (6 \text{ Km rato} / 25 \text{ Km criança})$, dose animal = 1,04mg/kg

Para facilitar o cálculo da dose a ser administrada, esse valor foi arredondado para 1mg / kg.

Considerando o estudo de Brower (2002) que relata que as doses de abuso de EAA atingem de 10 a 100 vezes as quantidades normalmente prescritas para fins médicos, optou-se por uma dose 2,5 vezes maior que a dose terapêutica calculada (1mg / kg) admitindo-a ainda semelhante a terapêutica.

Todos os tratamentos foram aplicados por gavagem e foram realizados por 4 semanas.

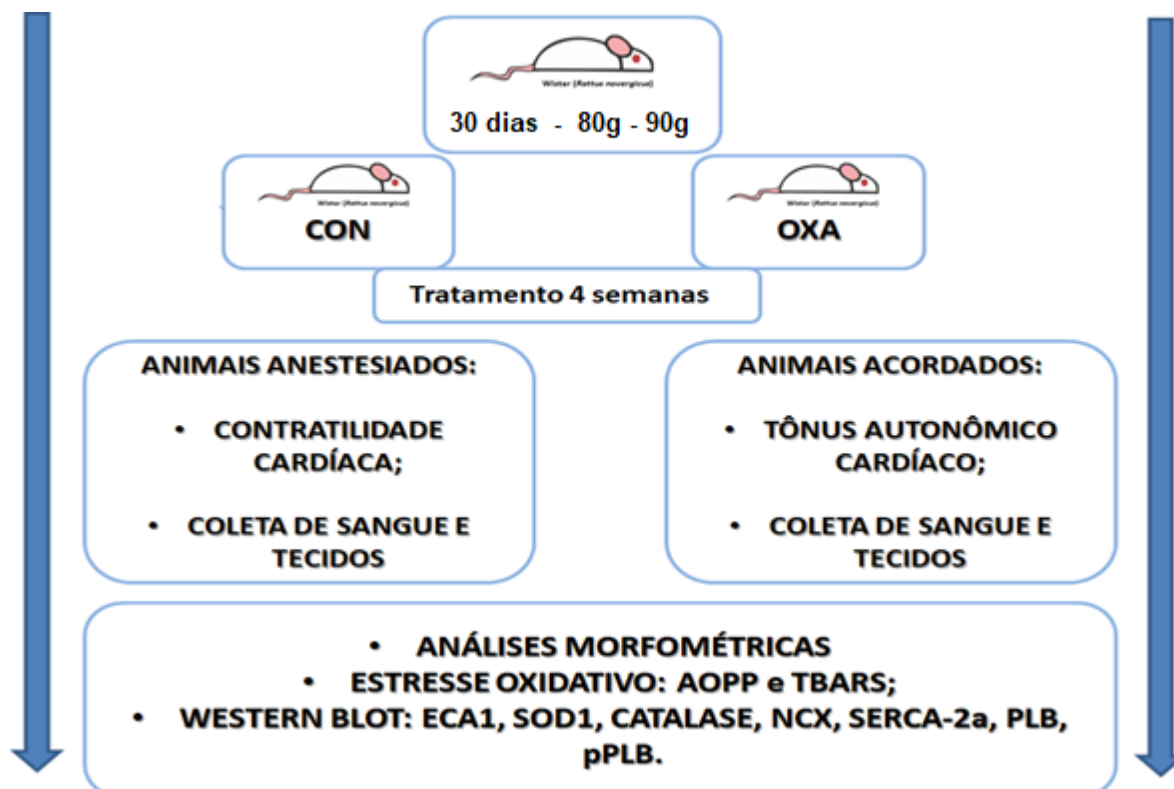


Figura 4: Resumo dos protocolos experimentais.

3.2 AVALIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

De 7 a 8 animais foram usados somente para este protocolo funcional.

Para implantação de cateter na artéria e na veia femoral foi feita uma incisão inguinal. Os vasos foram isolados e em cada um foi inserido um cateter de polietileno (PE10-PE50 fundido) preenchido com solução salina heparinizada, com a finalidade de acessar a circulação sistêmica e assim aplicar os fármacos e também fazer os registros ao ligar o cateter a um transdutor acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo MP100-CE, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, EUA). Os tônus autonômicos cardíacos dos ratos wistar foram avaliados pelo protocolo adaptado de Chapleau e Sabharwal (2011) e semelhante ao de Huijing (2013). Então, os tônus autonômicos cardíacos simpático e parassimpático foram estimados através de bloqueadores farmacológicos seletivos dos receptores muscarínicos (N-metilatropina) e dos receptores β 1-adrenérgicos (atenolol) em animais acordados. O tônus parassimpático cardíaco foi estimado através da variação da FC basal 15 minutos depois de uma única injeção de atropina (2 mg/kg, i.v.), que atinge um efeito de platô,

aproximadamente nesse tempo, e tem a duração de aproximadamente 4 horas. Imediatamente depois, foi injetado atenolol (4 mg/kg, i.v.), que também atinge um efeito máximo 15 minutos depois, e este valor foi considerado como a FC intrínseca (marcapasso). No dia seguinte, a sequência das injeções foi invertida e o tônus simpático cardíaco foi estimulado através da variação da FC basal 15 minutos após o atenolol e o FC intrínseca cerca de 15 minutos sob o bloqueio duplo.

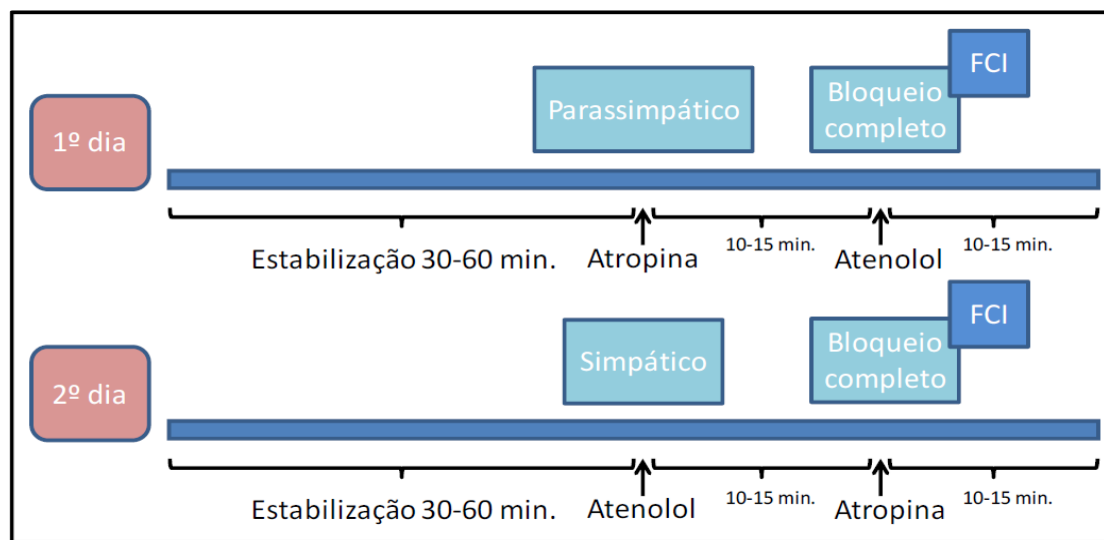


Figura 5. Esquema resumido do protocolo de avaliação do tônus autonômico cardíaco.

Fonte: Klippel, 2016

3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA.

De 6 a 7 animais foram utilizados somente para este protocolo funcional. A função ventricular esquerda (VE) dos ratos wistar foi avaliada pelo protocolo de Wang et al (2003). Após as 4 semanas de tratamento os animais foram anestesiados com mistura de quetamina (100 mg/kg, AGENER, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, Brasil) via intraperitoneal. Anestesiados e após tricotomia e antisepsia da região mediana e lateral direita da traqueia, os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas dianteiras fixadas abertamente, cabeça na base inferior da mesa cirúrgica. Em seguida, 3 cm abaixo da sínfise mandibular, a 1cm a direita da linha mediana, foi realizada uma pequena incisão mediana de 2 cm na pele. Após retirar fáscia superficial que envolve os tecidos no local e visualizar os músculos esterno hioideo e esternocleidomastoideo, foi localizada a traqueia, carótida comum direita e o nervo vago, ao lado e abaixo deste trígono, a traqueia foi separada e dissecada do nervo vago. A porção cranial foi ligada com fio cirúrgico e após uma pequena incisão na parede da artéria carótida comum direita foi inserido

cateter de polietileno (PE 50) preenchido com salina e heparina. O cateter foi ligado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo MP100-CE, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, EUA). Após 15 minutos de estabilização, foram registadas as pressões arteriais sistólica e diastólica. O cateter foi introduzido no ventrículo esquerdo para aferição dos parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo, a saber:

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

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

3.4 RETIRADA DOS TECIDOS

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram retirados, limpos e pesados para as análises. O coração teve suas câmaras separadas e o ventrículo esquerdo (VE) foi dividido, entre as análises morfométricas, de *western blot* e outras. Os VEs foram armazenados em solução de formol (10%) tamponado para as análises histológicas. A razão do peso coração/tíbia, foi usada como índice de possível hipertrofia.

3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após 24h na solução de formol, os tecidos cardíacos foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo manual rotativo (LEICA - modelo RM2125 RTS), com espessura de 5 μm . Os cortes dos corações foram corados com hematoxilina/eosina (H&E), para proceder com as análises morfométricas. Para isto, 10 campos de cada animal serão fotografados no aumento de 400X e o número de miócitos por campo e a área, perímetro, largura e comprimento dos miócitos serão compilados com o auxílio de um software de obtenção de imagens (Motic Cam Plus[®]). Outros cortes do coração foram corados utilizando o corante especial Picrossiriusred

(Sirius Red), a fim de identificar a deposição de colágeno nestes órgãos. Para tanto, 10 campos de cada animal foram fotografados (400X) e o percentual de colágeno foi obtido em cada grupo de tratamento. A análise da área do colágeno foi realizada utilizando o Software Image J®.

3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

A técnica utilizada para detecção da expressão das proteínas SERCA-2a, PLB e p-PLB (fosfo-serina-16-fosfolambam; p-Ser16-PLB), trocador NCX, ECA e das enzimas antioxidantes SOD1 e catalase no ventrículo esquerdo foi a de western blot. O tecido do ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de lise (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de Na₄P₂O₇.10H₂O, 1 mmol / L de MgCl₂, 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na₃VO₄). As proteínas totais foram medidas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Vinte e cinco microgramas de proteína foram diluídos em tampão (5x - 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e foram separados por eletroforese usando SDS-PAGE.

As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Biorad). Após incubação com solução de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween a 0,05% e leite Molico Nestle 5%), as membranas foram incubadas a 4°C, durante a noite com anticorpos específicos primários: anticorpos primários: anti-SERCA-2a ([1:1000], Affinity BioReagents, CO, USA); anti-PLB ([1:1000], Affinity BioReagents, CO, USA), anti-p-Ser16-PLB ([1:1000], Abcam, Inc., USA), anti-ACE1 ([1:200], NDLta Cruz, Inc., USA), Inc., USA); SOD 1 ([1:500] Sigma, Estados Unidos) CATALASE (CAT) ([1:2000] Sigma, Estados Unidos) e anti-Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:1000], Merck Millipore, Germany). Em seguida, as membranas foram lavadas (5 min três vezes) e incubadas durante uma hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:5.000]: anti-IgG mouse (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) anti-IgG rabbit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anti-IgG goat, e anti-IgG mice, Millipore, Massachusetts, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (Luminata HRP Substrate-Millipore) e a reação foi captada e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 5.2.1. Em cada ensaio experimental fez-

se a normalização em relação ao controle, sendo GAPDH para todas as proteínas analisadas no tecido cardíaco por este protocolo, com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Para análise do p-Ser16-PLB foi realizado a razão p-Ser16-PLB/PLB total. Os resultados foram expressos como percentual (%) do controle.

3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação dos produtos advindos da ação dos radicais livres. Nesse sentido, foram quantificadas as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os produtos de oxidação proteica avançada (AOPP). A quantificação do AOPP foi realizada de acordo com o descrito por Witko-Sarsat et al., (1996) com modificações. Desta forma, os tecidos foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (PBS) e em seguida centrifugados (3500 rpm, 10 min). O sobrenadante foi misturado a iodeto de potássio (1.16mM) e ácido acético em placa de 96 poços, após 6 minutos de incubação a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 340nm (Filter Max F3/F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, USA). O resultado é obtido por meio da interpolação dos resultados em uma curva padrão construída com diferentes concentrações de Cloramina T (5-100uM). Os resultados foram expressos em equivalentes de Cloramina T/mg de proteína (uM/mg de proteína).

Para a determinação do TBARS, os homogenatos foram misturados com uma solução de ácido tiobarbitúrico (1%) em seguida levados a ebulição por uma hora e em seguida resfriados a temperatura ambiente. Alíquotas da mistura reacional serão adicionadas em placas de 96 poços e a absorbância foi lida em leitor de microplacas em 532nm (Patočková, Kršiak, Marhol, & Tůmová, 2003). Foi confeccionado uma curva padrão com malondialdeído (0,1-5uM) (MDA; Sigma-Aldrich) e os resultados foram expressos como equivalentes de MDA/mg de proteína.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo analisados por teste T não pareado de Student com níveis de significância estabelecidos por $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL INICIAL E FINAL

Na tabela 1 encontram-se os valores do peso inicial e final dos grupos estudados. Observa-se que os resultados não demonstraram diferença estatística entre os grupos.

Tabela 1: Valores dos pesos dos grupos CON e OXA.

n=7	COM	OXA
Peso corporal inicial (g)	84,5 ± 5,0	83,33 ± 3,0
Peso corporal final (g)	286,5 ± 24	315,1 ± 12,0
Varição do peso (g)	202 ± 24	234 ± 11

Teste T não pareado de Student.

4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM OXA SOBRE O TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

No grupo CON, o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina resultou em um significativo aumento na FC basal, de $362 \pm 9,2$ bpm para $505 \pm 7,7$ bpm, indicando um tônus vagal de +143 bpm. No grupo OXA, a variação na FC basal foi de $349 \pm 7,4$ bpm para $483 \pm 12,1$ bpm (variação de +134 bpm), não apresentando então diferença do tônus vagal comparado com os animais controle, de acordo com a figura 5 (painel esquerdo).

O bloqueio dos β_1 -adrenoceptores com atenolol, que foi usado para avaliar o tônus simpático cardíaco, causou resultados opostos, como observado na figura 5 (painel direito). A FC basal foi reduzida para 320 ± 10 bpm (-40 bpm) no grupo CON. Nos animais OXA tratados a magnitude da redução da FC basal 285 ± 17 bpm (-64 bpm), não havendo diferença entre os grupos estudados.

A FC intrínseca, que foi considerada como a FC sob o duplo bloqueio com atropina e atenolol, foi semelhante nos dois grupos de animais (figura 6).

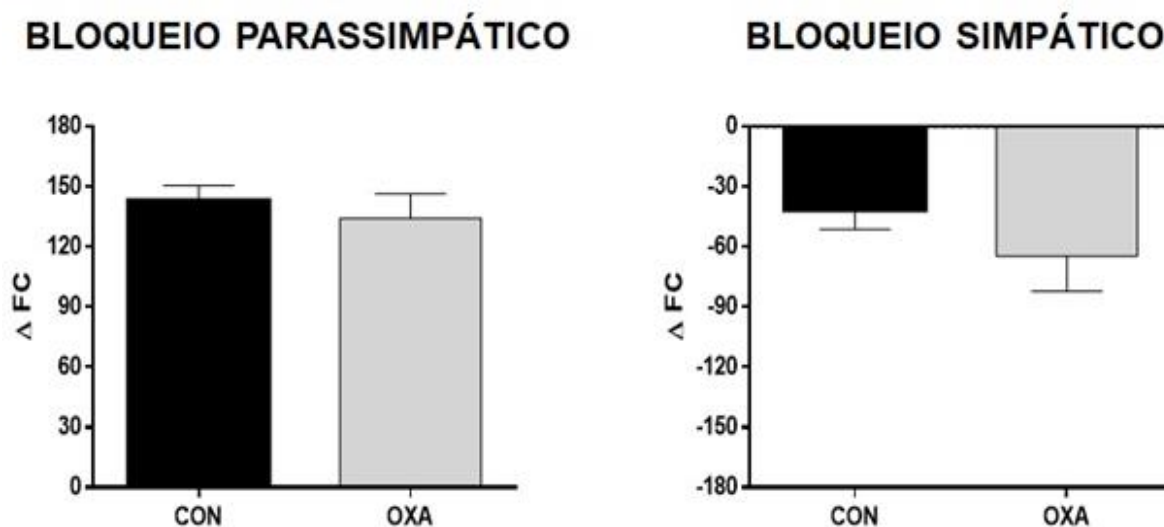


Figura 6. Efeitos do tratamento com OXA (oxandrolona) sobre tónus autonômico cardíaco dos ratos wistar. Esquerda: Variação da FC após bloqueio parassimpático. Direita: Variação da FC após bloqueio simpático; N= 7 por grupo. Teste T não pareado de Student.

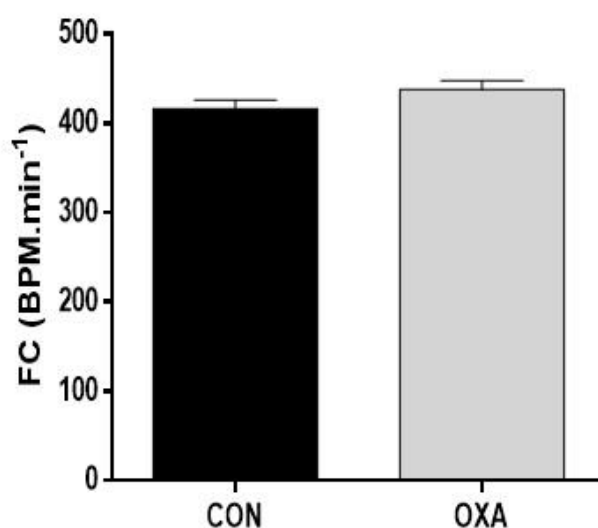


Figura 7. Efeitos do tratamento com OXA (oxandrolona) sobre a FC intrínseca dos ratos wistar. N=8 por grupo. Teste T não pareado de Student.

4.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO SISTÓLICA VENTRICULAR ESQUERDA E PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE

Na tabela 2 estão apresentados os dados da pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE) e parâmetros de contratilidade. A figura 7 mostra que o tratamento com OXA (123 ± 5 mmHg) aumentou o PSVE quando comparado ao controle (109 ± 4 mmHg).

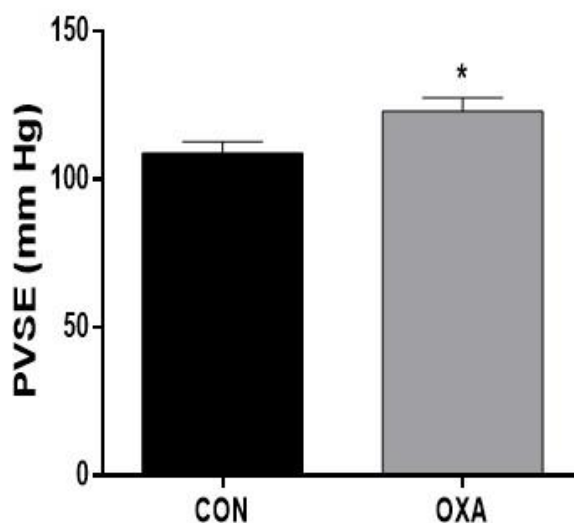


Figura 8. Medida da Pressão ventricular sistólica esquerda dos grupos CON e OXA (oxandrolona). Os valores foram apresentados com média \pm EPM. $n=6$, * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

Tabela 2: Efeitos do tratamento com oxandrolona nos parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo e níveis de pressão arterial média, sistólica e frequência cardíaca.

	CON	OXA
Parâmetros de contratilidade (animais anestesiados)		
dP/dt max + (mmHg/s)	5138 \pm 238,6	5469 \pm 135,7
dP/dt min - (mmHg/s)	-3785 \pm 109,9	-4564 \pm 443,9
Tau (s)	0,0191 \pm 0,002644	0,01772 \pm 0,002442
PSVE (mm Hg)	108,9 \pm 3,887	123,1 \pm 4,618*
PAM, PAS e FC (animais acordados, valores obtidos antes da avaliação do tônus autonômico)		
PAM (mm Hg)	98,8 \pm 6,1	108,9 \pm 4,4
PAS (mm Hg)	143,0 \pm 4,5	151,6 \pm 4,9
FC (bpm.s ⁻¹)	362 \pm 9,2	349 \pm 7,4

Os valores foram apresentados com média \pm EPM. $n=7$, * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

4.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Na tabela 3 estão representados os resultados referentes ao peso do ventrículo esquerdo (VE), comprimento da tíbia (CT) e a razão do peso do VE com o comprimento da tíbia (VE/CT). Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao peso dos ventrículos e comprimento da tíbia.

Tabela 3: Efeito do tratamento com Oxandrolona sobre o peso do ventrículo esquerdo, comprimento da tíbia, razão do peso ventrículo esquerdo/comprimento da tíbia.

n=6	VENTRÍCULO ESQUERDO- VE (g)	COMPRIENTO DA TÍBIA - CT (cm)	VE/CT (g/cm)
CON	0,5515 ± 0,06144	3,783 ± 0,07923	0,1256 ± 0,01919
OXA	0,4917 ± 0,05759	3,817 ± 0,1014	0,1132 ± 0,01153

A figura 9 mostra que o tratamento com OXA reduziu o número de núcleos dos miócitos por campo (CON 23,7 ± 0,82 e OXA 19,0 ± 0,61; *p < 0.05).

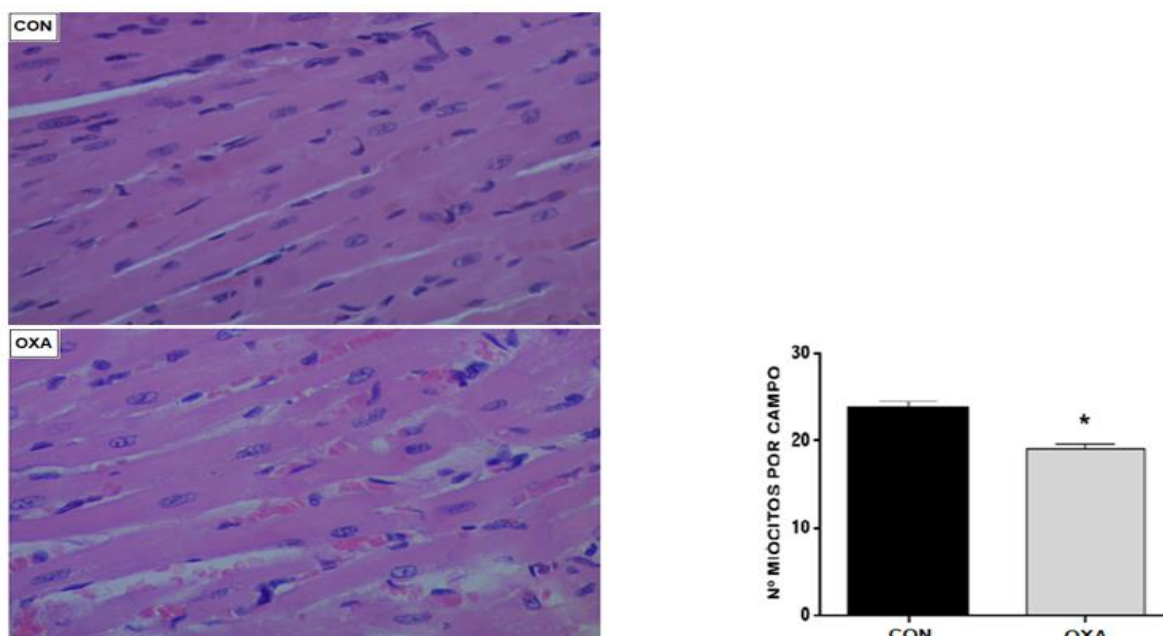


Figura 9. Análise morfológica dos do ventrículo esquerdo (VE). Esquerda: lâminas Histológicas representativas do VE nos grupos Controle (CON) e Oxandrolona (OXA). Direita: gráficos de coluna representando os núcleos dos cardiomiócitos dos grupos CON e OXA. As amostras foram coradas pelo

método Hematoxilina/Eosina (H&E) e fotografadas no aumento de 400x. Os valores foram apresentados com média \pm EPM. $n=6$, * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

A figura 10 mostra que a OXA provocou aumento na área dos núcleos dos miócitos cardíacos comparado com o grupo controle (CON: $3241 \pm 100 \mu\text{m}^2$ vs OXA: $4102 \pm 295 \mu\text{m}^2$; * $p < 0.05$; Figura 9A). OXA também promoveu aumento no perímetro dos núcleos dos miócitos cardíacos comparado com o grupo controle (CON: $272 \pm 4,0 \mu\text{m}^2$ vs OXA: $307 \pm 8,0 \mu\text{m}^2$; * $p < 0.05$; Figura 9B), assim como no comprimento dos núcleos dos miócitos cardíacos comparado com o grupo controle (CON: $115,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$ vs OXA: $130,8 \pm 4,60 \mu\text{m}$; * $p < 0.05$; Figura 9C). A OXA não provocou aumento significativo na largura dos núcleos dos cardiomiócitos comparado com o grupo controle (CON: $36,75 \pm 1 \mu\text{m}$ vs OXA: $39,89 \pm 2,3 \mu\text{m}$; Figura 9D).

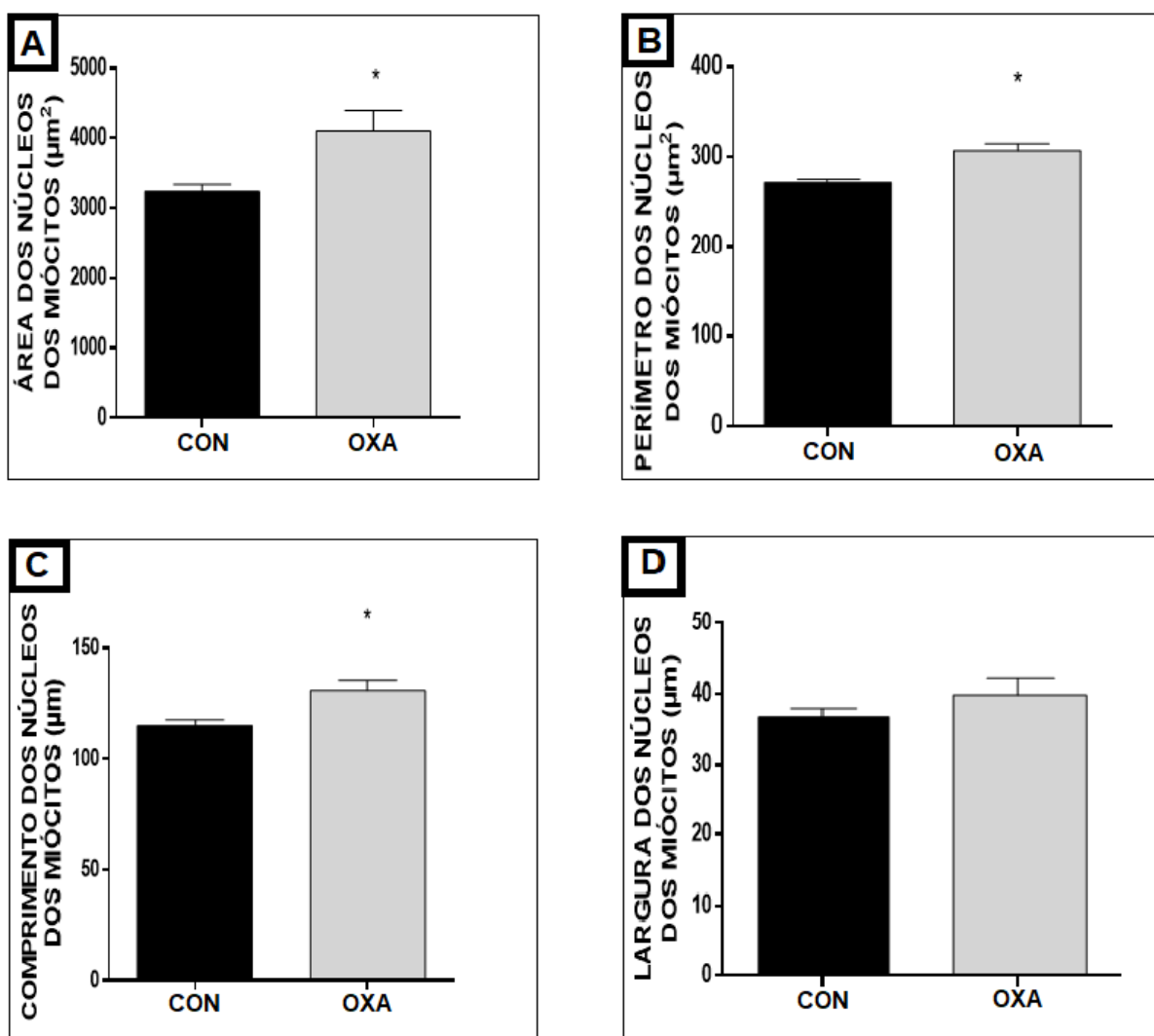


Figura 10. Análise morfométrica do VE dos grupos CON e OXA. Lâminas coradas com o método Hematoxilina/Eosina (H&E). 400x. Os gráficos de barra representam: Painel A área dos núcleos dos

miócitos; Painel B, perímetro dos núcleos; Painel C, comprimento dos núcleos e Painel D, largura dos núcleos. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M; n=6; * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

A figura 11 mostra a coloração de picrosíriusred que cora em vermelho o colágeno, nas lâminas do VE fixado dos grupos CON e OXA. A OXA aumentou o depósito de colágeno total nos animais tratados.

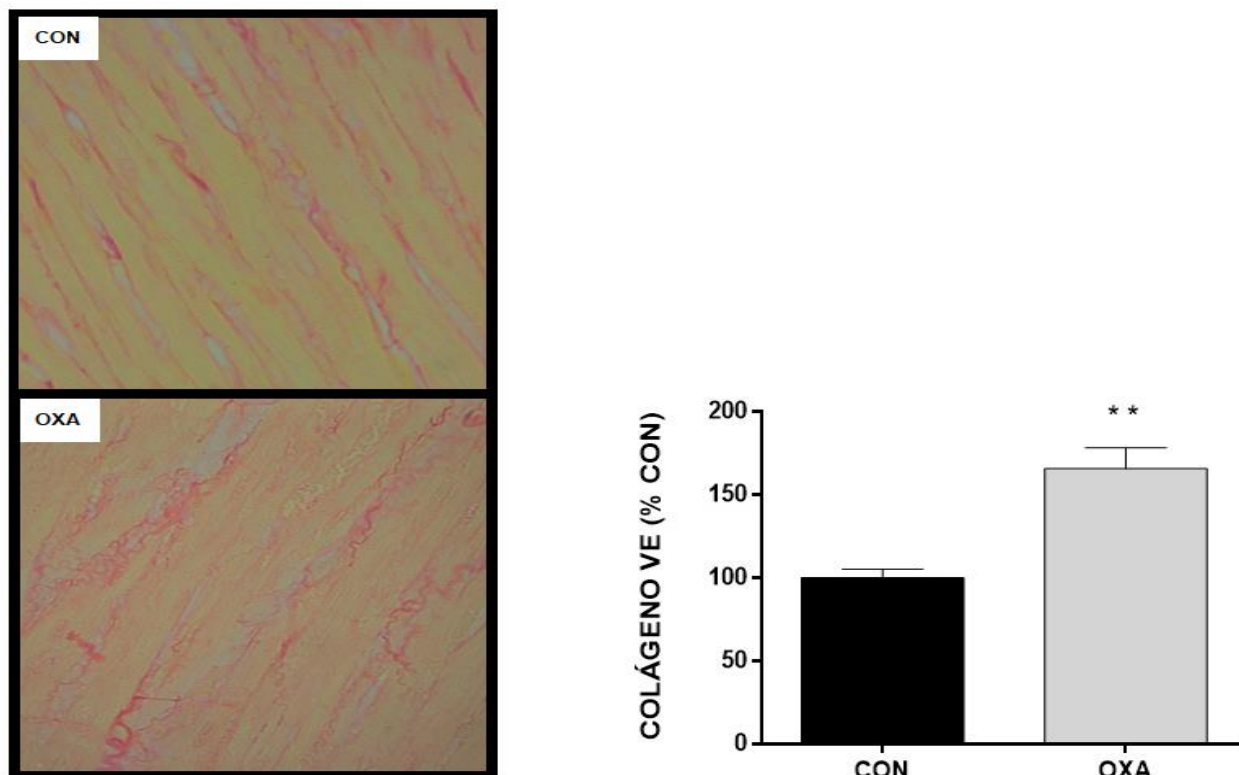


Figura 11: Análise Histológica do coração dos grupos CON e OXA, lâminas de VE após coloração de Picrosirius Red. 400x. Esquerda: lâminas Histológicas representativas do VE nos grupos Controle (CON) e Oxandrolona (OXA). Direita: gráfico de colunas representando porcentagem de deposição de colágeno no VE dos ratos dos grupos CON e OXA. Os valores foram apresentados com média \pm EPM. n=6, ** $p < 0,01$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM OXA SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSIENTE DE CÁLCIO (SERCA-2A, PLB e P-PLB e NCX)

4.5.1 Avaliação da expressão proteica da serca-2a no ventrículo esquerdo.

Na figura 12A encontram-se os valores referentes à análise da expressão proteica da SERCA-2a, onde o tratamento com OXA não altera a expressão desta proteína (127,4% \pm 19,07%) em relação ao grupo Controle (100% \pm 13,65%). Contudo, foi

observado que a OXA promoveu aumento da razão Serca2a com a PLB (12B), tal razão, avalia a atividade da SERCA-2a.

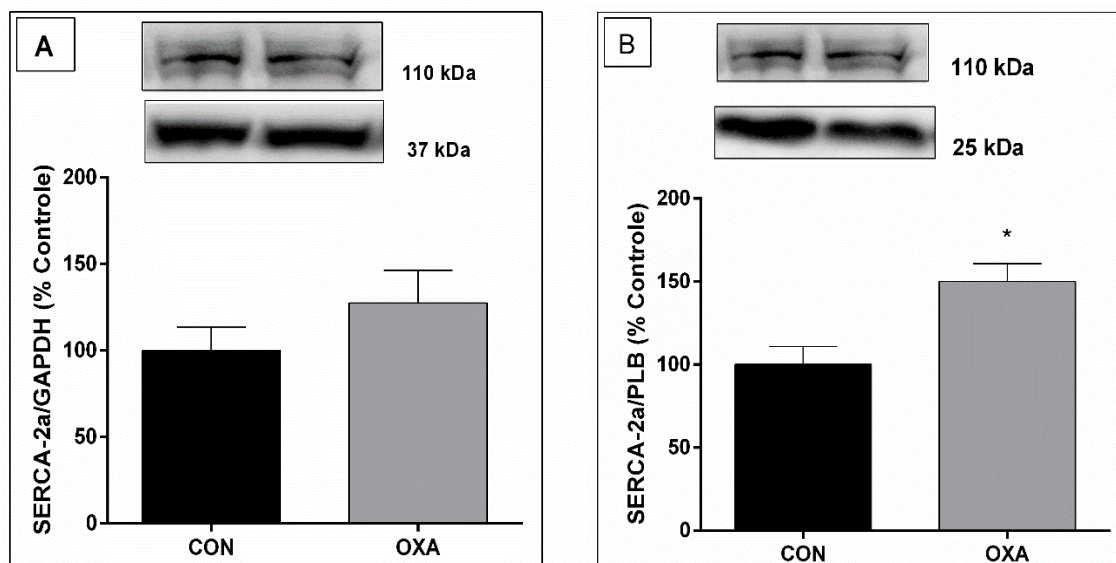


Figura 12: Expressão proteica da SERCA-2a em ventrículos esquerdos e razão com PLB de animais controle (CON) e oxandrolona (OXA). Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=5 por grupo). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M; * p < 0,05 vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

4.5.2. Expressão proteica da PLB no ventrículo esquerdo

O tratamento não alterou a expressão da PLB, pois não foram observadas alterações significativas entres os grupos (CON: $100 \pm 8,9\%$; OXA: $89,0 \pm 6,8\%$). Para avaliar a proporção do p-Ser16-PLB, foi calculada a razão entre a quantidade PLB total e porção da p-PLB. Desse modo, na figura 13 B observa-se que o tratamento com o OXA reduziu a proporção ($49,8 \pm 6,3\%$) quando comparado ao grupo CON ($100 \pm 16,1\%$)

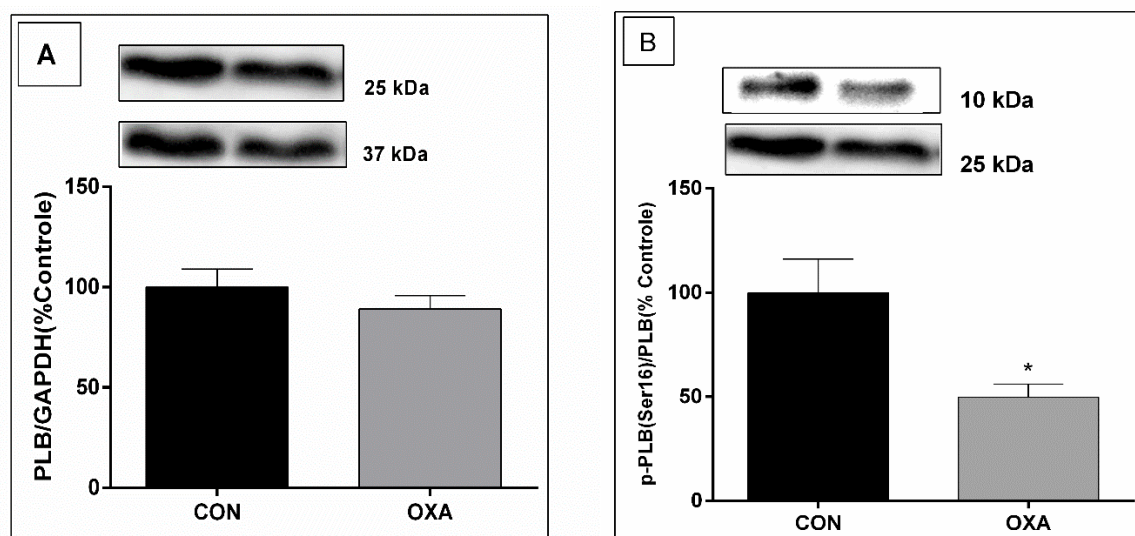


Figura 13. Expressão proteica da PLB no ventrículo esquerdo e razão p-PLB / PLB. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=5 por grupo). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M; * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

4.5.3. Expressão proteica do NCX

A figura 14 mostra os resultados da expressão proteica do NCX, onde o tratamento com OXA não interferiu com a expressão desta proteína (CON: $100 \pm 2,88\%$; OXA: $93,86 \pm 15,07\%$).

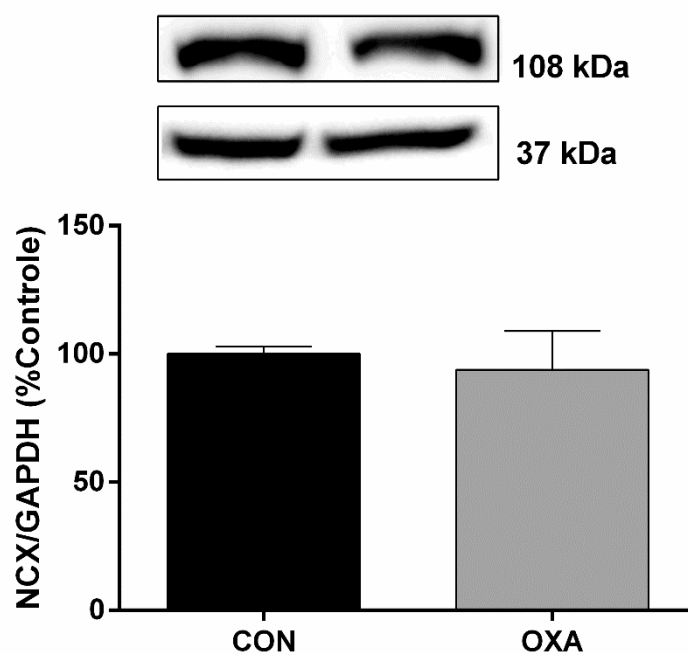


Figura 14: Expressão proteica do NCX em ventrículos esquerdos. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=3 por grupo). Teste T não pareado de Student.

4.6 ESTRESSE OXIDATIVO

O tratamento com OXA não promoveu alteração dos produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) em relação ao grupo controle (CON: $0,075 \pm 0,0022 \mu\text{M}$; OXA: $0,080 \pm 0,0021 \mu\text{M}$, Fig.15-A). A quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos corações dos animais tratados foi aumentada pelo tratamento com OXA (CON: $0,022 \pm 0,00096 \mu\text{M}$; OXA: $0,032 \pm 0,0052 \mu\text{M}$, Fig.15-B). Também foi observado aumento da expressão proteica da enzima SOD-1 (CON: $100 \pm 5,9\%$; OXA: $129,1 \pm 9,1\%$, Fig.15-C) e diminuição da expressão proteica da enzima catalase (CON: $100 \pm 13,8\%$; OXA: $54,4 \pm 4,8\%$, Fig. 15-D) após o tratamento com OXA.

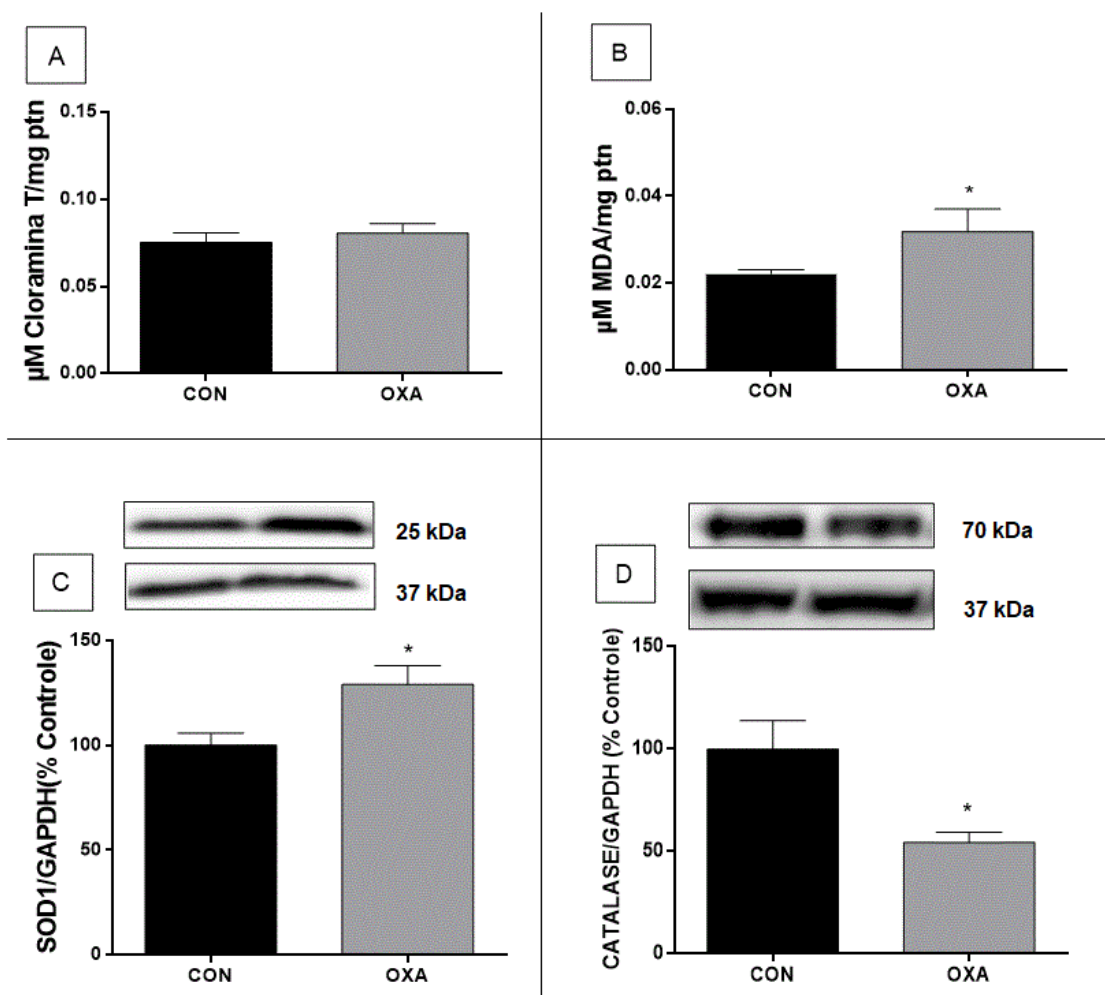


Figura 15. Análise dos componentes relacionados ao estresse oxidativo. (A) produtos de oxidação proteica avançada (AOPP); (B) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); E de enzimas antioxidantes. (C) SOD, (D) Catalase de ratos CON e OXA. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M; * $p < 0,05$ vs Grupo CON; Teste T não pareado de Student.

4.7 ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA - ECA

A figura 16 mostra à análise da expressão proteica da ECA, onde o tratamento com OXA aumentou significativamente a expressão desta proteína ($152,1\% \pm 16\%$) em relação ao grupo Controle ($92,9\% \pm 12,5\%$).

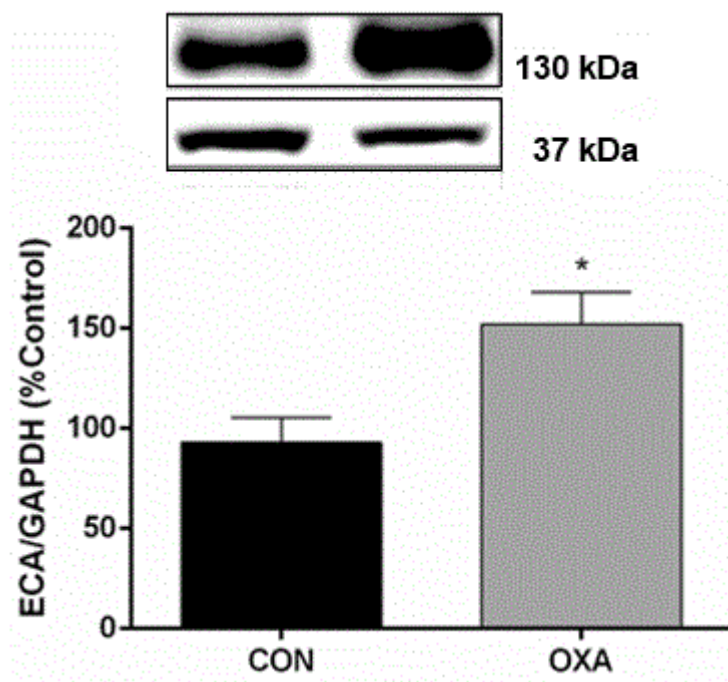


Figura 16. Expressão proteica da ECA em ventrículos esquerdos. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=5 por grupo). Teste T não pareado de Student.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo, até o momento, é o primeiro a relacionar o tratamento com dose semelhante a terapêutica do esteroide anabolizante OXA, com alterações estruturais como hipertrofia cardíaca com deposição de colágeno, que demonstra a existência de hipertrofia patológica, refutando a nossa hipótese inicial que o tratamento com a dose utilizada, não causaria efeitos deletérios no coração. Também foram observadas alterações nas razões das expressões das proteínas reguladores do cálcio citosólico (SERCA-2a/PLB total e p-PLB/PLB total), das enzimas antioxidantes catalase e SOD1 no ventrículo esquerdo de ratos, contudo sem alterações funcionais.

Os resultados encontrados na literatura, em relação a alterações no peso corporal pelo abuso de EAA, são divergentes. Seara et al (2017) demonstraram que ratos wistar, tratados com alta dose de propionato de testosterona 5mg/kg/dia por 5 semanas, não sofreram alterações significativas no peso corporal. Em contrapartida, Bissoli et al (2009) demonstraram ganho de peso em ratos wistar tratados com 20mg/kg de DECA por 4 semanas. No presente estudo, o tratamento com OXA na dose similar a terapêutica (2,5mg/kg/dia) não foi capaz de promover alterações no peso corporal entre os grupos, nossos resultados corroboram os observados por Grockett (1992) que não observou variação no peso corporal final em ratos Sprague-Dawley, apesar de ter usado dose maior do que a utilizada no nosso estudo (10mg/kg/dia de OXA por 27 dias).

A hipertrofia cardíaca foi quantificada por meio da análise histológica com medida do número de miócitos e medida da área, perímetro, largura e comprimentos dos núcleos. Foi demonstrado que somente o parâmetro largura dos núcleos não apresentou alteração no grupo OXA, todavia os outros parâmetros estavam alterados e demonstraram a evidência de hipertrofia cardíaca nestes animais. Ao quantificar o colágeno, foi verificado um aumento significativo na porcentagem de colágeno no grupo OXA em relação ao grupo CON.

Adicionalmente, a hipertrofia cardíaca pode ser fisiológica ou patológica, sendo que a hipertrofia cardíaca patológica está associada à deposição de colágeno (Tanno et al., 2011; Neves et al., 2013). Esses mesmos autores, ao utilizarem doses abusivas de DECA associada ou não a exercícios físico, demonstraram que os animais sempre apresentavam deposição de colágeno, ou seja, hipertrofia patológica. Desta forma,

inferimos que a hipertrofia cardíaca observada com o uso de OXA foi do tipo patológica, uma vez que, houve aumento da deposição de colágeno, neste grupo.

Os EAA podem induzir a hipertrofia cardíaca por diversos mecanismos, um desses mecanismos pode ser por estimularem receptores de andrógenos amplamente expressos em cardiomiócitos, que podem induzir diretamente uma resposta hipertrófica em decorrência da ação do androgênio no coração (Marsh et al., 1998). Este mecanismo, seria o mecanismo de ação genômica dos EAA, de ação direta sobre o material genético e conseqüente alteração da matriz estrutural. Essa ação genômica da OXA pode ter contribuído para o surgimento da hipertrofia cardíaca no grupo OXA.

Adicionalmente, considerando outros possíveis mecanismo pelos quais a OXA pode promover hipertrofia cardíaca e principalmente a deposição de colágeno, podemos inferir o papel do SRA. O tratamento com OXA promoveu aumento de aproximadamente 50% na expressão proteica da ECA no tecido cardíaco dos animais, podendo sugerir a participação da ANG II na hipertrofia observada. A ANG II possui ações cronotrópicas e inotrópicas no coração, regulando assim a função cardíaca, possui ação direta nos fibroblastos cardíacos, resultando em hipertrofia dos miócitos por meio do receptor AT1 estabelecendo o remodelamento cardíaco (Tran, Sgchwarzbard e Weintraub, 2011). Os receptores AT2 podem contribuir para hipertrofia, como foi demonstrado na literatura que a fibrose cardíaca e deposição de colágeno estão relacionados à ativação do receptor AT2 pela ANG II (Ichihara et al., 2001). Da mesma forma, Brilla et al (1994) previamente já haviam demonstrado que a inibição da atividade de colagenase induzida pela ANG II é mediada por receptores AT2, efeito que contribui para deposição de colágeno. O papel da ANG II na hipertrofia cardíaca ocasionada pelos EAA, é confirmada por estudos utilizando inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA). Esses estudos mostraram que os IECAS reduzem ou previnem a hipertrofia do miocárdio em ratos normotensos e hipertensos tratados com EAA, além de prevenir o aumento da deposição de colágeno, demonstrando o importante papel do SRA na geração da hipertrofia patológica nestes animais (Andrade et al., 2011; Melo Junior et al., 2018).

Embora não tenha sido possível avaliar no nosso estudo a expressão de citocinas no coração, é bem determinado que o remodelamento cardíaco pode ser induzido pela produção de citocinas com caráter pró-inflamatório (Yokoyama et al., 1997). Há evidências crescentes da ligação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o

TNF- α e a ativação de cascatas de sinalização inflamatória mediadas pelos EAA (Du Toit et al., 2005; Riezzo et al., 2011) e a ativação do SRA. O mecanismo mais provável para a produção de citocinas pró-inflamatórias no coração, envolve a participação de uma proteína chamada MAP-Kinase p38 (p38 MAPK), visto que a produção do TNF- α é dependente da translocação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B), que ocorre em virtude da ativação da via da p38 MAPK (Wang et al., 2005). A relação da ANG II e citocinas pró-inflamatórias pode ser demonstrada pelo estudo de Andrzejczak et al (2007). Eles mostraram que ao administrar lipopolissacarídeos a animais SHR, houve aumento da produção de TNF- α e IL6, por meio da ANG II, que pode ser demonstrado, ao tratarem os animais com antagonistas de receptores AT1 e IECA, houve redução dessas citocinas.

Abaixo descrevemos como os EAA podem participar dessas vias de sinalização para o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Neste sentido, estudo de Gomes et al (2015), utilizando ratos Sprague-Dawley tratados com DECA, apresentaram super expressão de TNF- α e p38-MAPK, mostrando que os esteroides anabólicos parecem ativar essa via. Em estudo onde a hipertrofia cardíaca e a deposição de colágeno foram induzidas por alta dose de DECA em ratos wistar, um IECA preveniu essas alterações, assim como o aumento da ECA e de TNF-alfa no coração (Franqini et al, 2013). Em contrapartida, em ratos SHR tratados com DECA, os efeitos deletérios de aumento da PAS e da hipertrofia cardíaca foram reduzidos com Enalapril, entretanto, o aumento de TNF- α evocado pelo esteroide anabolizante não foi revertido pelo IECA (Melo Junior et al., 2018), mostrando assim, que o TNF-alfa pode ser direta e indiretamente modulado pelos EAA, e que outros mecanismos podem estar envolvidos.

Outro mecanismo importante para gerar hipertrofia cardíaca, pode ser uma maior resposta inotrópica positiva pela elevação das concentrações de AMPc, gerado pelo aumento do influxo de Ca^{2+} (Velasco et al., 2002; Schwartz et al., 2016). Possivelmente o aumento da resposta inotrópica se dê pelo aumento da fosforilação no processo de estimulação β -adrenérgico pelas catecolaminas, mediada pela cascata de AMPc, sendo considerada responsável pelo aumento na velocidade de contração do miocárdio (Miyakoda et al., 1987). Após a ativação do receptor beta-adrenérgico, a adenilil-ciclase aumenta a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em

AMPC, ativando a proteína quinase A (PKA). Então a PKA fosforila vários componentes da via de acoplamento excitação-contração como, troponina I, canais de Ca^{2+} tipo L e fosfolambam promovendo um aumento no inotropismo. A fosforilação do canal de Ca^{2+} do tipo L aumenta a corrente de cálcio, aumentando a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do RS (Parks; Howlett, 2013). A fosforilação da fosfolambam por proteínas quinases dependente de AMPC ou dependente de calmodulina (CaMKII) impede a inibição da SERCA-2a, aumentando assim, a captação de Ca^{2+} , resultando em uma rápida extrusão Ca^{2+} citosólico. A fosforilação da troponina I também contribui para o relaxamento ao promover a dissociação do Ca^{2+} dos filamentos musculares (Bers, 2002; Parks; Howlett, 2013).

Ao relacionarmos os mecanismos citados acima que poderiam estar envolvidos com a hipertrofia cardíaca observada nos animais OXA, primeiro iremos discutir o envolvimento das proteínas envolvidas com a mobilidade do cálcio e a contratilidade cardíaca e posteriormente a relação do tônus simpático com essa alteração estrutural.

No nosso estudo, não observamos alteração da contratilidade cardíaca o que explicaria, pelo menos em parte, a hipertrofia observada. Mas encontramos alterações nas proteínas de mobilidade do cálcio no ventrículo esquerdo desses animais. Analisando esses resultados, tivemos redução de 50% da razão entre a expressão p-PLB/PLB total, que poderia levar a redução da contratilidade por maior inibição da SERCA-2a, mas em contrapartida, observamos aumento da razão SERCA-2a/PLB, que favorece aumento da contratilidade, além de ter permanecido inalterado a expressão do NCX, o que pode ter mantido a contratilidade em níveis normais, mantendo um equilíbrio no cálcio citosólico .

Em estudos anteriores do nosso laboratório demonstramos que doses abusivas de DECA levam a aumento da contratilidade cardíaca em fêmeas wistar (Nascimento et al., 2016) e em machos SHR (Melo Júnior et al., 2018) provavelmente por aumentarem a expressão da SERCA-2a e do p-PLB, favorecendo a aumento da contratilidade. Possivelmente, se a administração de OXA fosse realizada com dose abusiva, poderíamos ter observado aumento da contratilidade cardíaca nestes animais. Entretanto, nem sempre o uso de EAA leva a aumento da contratilidade, uma vez que, estudo de Rocha e colaboradores (2007) usando dose abusiva de DECA, não mostrou alteração da contratilidade nos animais tratados comparado aos seus controles. Apesar de não termos encontrado alteração na contratilidade cardíaca no presente

estudo, é importante salientar que o remodelamento cardíaco desempenha um importante papel na fisiopatologia da disfunção ventricular e que as alterações, estruturais, bioquímicas e genéticas do processo resultarão em prejuízo progressivo da funcionalidade do coração (Zornoff et al., 2009), neste sentido, estudos que avaliem o uso de EAA por longo períodos e em doses elevadas são importantes, uma vez que em dose considerada baixa, já observamos hipertrofia patológica nos animais do grupo OXA.

Neste estudo, o tratamento com OXA aumentou a PSVE quando comparado ao grupo controle, desta forma sugerimos que essa alteração provém de alteração na pós-carga em decorrência do aumento da resistência vascular periférica que pode ter sido promovida diretamente pela OXA. Estudo que utilizou EAA em doses altas observaram prejuízo da reatividade vascular em ratos wistar (Caliman et al., 2017) e em seres humanos (Lane et al., 2006).

De acordo com as análises da modulação autonômica do coração que poderia alterar o componente simpático cardíaco e contribuir para maior efeito inotrópico e conseqüentemente a hipertrofia cardíaca, em nosso estudo a administração de OXA por um período de 4 semanas, na dose de 2mg/Kg/dia em ratos wistar não promoveu alteração no controle autonômico cardíaco, portanto não apresentaram disautonomia. O método utilizado no presente estudo para avaliar o tônus autonômico, levou em conta, o aumento da FC logo após administração do bloqueador do receptor muscarínico, atropina, definindo o tônus vagal presente sob condições de repouso, e a diminuição da FC após a administração do bloqueador β 1-cardíaco, atenolol, definindo o tônus simpático cardíaco. Enquanto o duplo bloqueio possibilita a determinação da FC intrínseca. Em estudo utilizando stanazolol em 2 grupos de ratos wistar tratados com 5mg/kg e 20mg/kg, respectivamente por 8 semanas, foi observado que apesar de promover aumento na pressão sanguínea e alteração na atividade barorreflexa, não houve alteração no tônus simpático (Beutel, Bergamaschie e Campos 2005). No entanto, em um estudo do nosso grupo, ratos wistar tratados com DECA 10mg/kg por 4 semanas tiveram menor valor basal de FC do que ratos controle, podendo indicar alteração do tonus autonômico (Andrade et al., 2008). Outros estudos demonstraram que doses supra terapêuticas de EAA em ratos, promovem aumento da estimulação simpática e disautonomia cardíaca (Turillazzi et al., 2011; Nascimento; Medei 2011). Esses autores observaram disautonomia cardíaca, com aumento da

modulação simpática e redução da modulação parassimpática cardíaca. As diferenças entre esses estudos, provavelmente, se dão devido aos diferentes protocolos aplicados, diferentes EAA e vias de administração, bem como tempo de tratamento, espécie e idade dos animais. No nosso estudo, utilizamos dose baixa de OXA, mimetizando a dose terapêutica em humanos, talvez seja o motivo de não termos encontrado alteração do tônus autonômico.

A fisiopatologia de doenças relacionadas ao coração está ligada, entre outros fatores, ao estresse oxidativo, desse modo ERO como $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , podem ser formados pelo citocromo P-450, xantina-oxidase, pelo transporte mitocondrial de elétrons, ou ainda diretamente, pela superfamília da NOX (Aguirre; Lambeth, 2010). Por outro lado, as enzimas antioxidantes, tais como a SOD e Catalase desempenham um papel fundamental na homeostase das ERO (Touyz et al., 2004).

Conceitualmente, o desequilíbrio entre os compostos pró-oxidantes e as defesas antioxidantes leva ao estresse oxidativo, mas esse conceito foi redefinido como a disrupção da sinalização e controle redox (Jones, 2008).

Neste contexto, o equilíbrio redox no tecido cardíaco foi analisado medindo a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 e Catalase e a oxidação de proteínas (AOPP) e peroxidação lipídica (TBARS) no presente estudo. A OXA promoveu aumento da expressão da SOD1 e da peroxidação lipídica (TBARS), bem como a redução da expressão da catalase, assim, essas alterações poderiam levar a maior formação de peróxido de hidrogênio favorecendo ao desequilíbrio REDOX, entretanto não foi observado aumento na oxidação de proteínas (AOPP), podendo indicar uma fase de transição dos efeitos da OXA sobre esses sistemas.

Como é bem conhecido, a alta concentração de $O_2^{\bullet-}$ produzida, pode inativar enzimas, promover oxidação de proteínas, agindo principalmente na cisteína ou pode iniciar a peroxidação de lipídios de membrana (Fukai; Ushio-Fukai, 2011). Provavelmente seja este o motivo pelo qual não observamos diferença significativa no teste da AOPP, uma vez que, a enzima que dismuta o $O_2^{\bullet-}$, a SOD1, estava superexpressada, possivelmente para se contrapor a indução de estresse oxidativo, ocasionado pelo tratamento com OXA. De comum acordo, quão maior os níveis de ERO, maiores são os danos oxidativos, bem como a geração de outros radicais mais reativos. Ademais, considerando que a produção de ERO até determinado nível desempenha funções

fisiológicas envolvendo a sinalização redox, síntese de DNA e expressão de genes relacionados ao crescimento e a regulação de acoplamento excitação-contração do miocárdio (Gao; Liu; Marban, 1996; Finkel, 1999; Li; Shan, 2004), nota-se então, a importância do balanço redox e como seu descontrole pode afetar o SCV.

Em relação a administração de EAA e estresse oxidativo, alguns resultados mostram que a administração crônica de DECA é capaz de levar a desbalanço redox celular, levando a um estado de estresse oxidativo, mas com diferenças tecido específicas. Embora seja outro tecido diferente do coração, no estudo de Chainy, Samantaray e Samanta (1997), o tratamento com 10mg de proprionato de testosterona induziu estresse oxidativo nos testículos dos ratos wistar adultos e atrofia. Em estudo anterior, Grockett (1992) que tratou com OXA ratos infantis de 23 dias de nascidos com 10mg/kg/dia por 37 (até a fase adulta) observou na histologia testicular grave depleção das células de Leydig indicando atrofia, embora não avaliado o estresse oxidativo, a disrupção do controle redox poderia contribuir para essas alterações, sem deixar de afetar o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, como os autores discutiram. A administração de 1mg/100g DECA/animal, uma vez por semana, durante 8 semanas levou a redução da atividade da catalase no rim e no fígado, sem alterar no coração. Enquanto a atividade da SOD é reduzida somente no fígado. Por sua vez a produção de H_2O_2 e a expressão genica da NADPH oxidase são aumentados somente no coração. (Frankenfeld et al.2014).

Observamos com esses resultados, que os EAA podem promover desbalanço redox em vários órgãos e que embora não tenhamos medido diretamente a produção de H_2O_2 e a expressão da NADPH oxidase, os dados mostrados no estudo anterior de Frankenfeld et al (2014), corrobora a nossa hipótese de possível aumento de ERO nos corações dos ratos tratados com OXA. Entretanto, o aumento na produção de ERO pode ainda não ter excedido a produção do sistema antioxidante e, portanto, não levado a oxidação de proteínas, assim como a possibilidade de outras enzimas antioxidantes estejam envolvidas na resposta a OXA e que não foram avaliadas, como a glutatona peroxidase.

Apesar de especularmos maior produção de H_2O_2 no coração dos animais OXA, neste estudo, esse aumento pode ainda não afetar a função cardíaca, o que pode acontecer quando o H_2O_2 está aumentado. Os níveis apropriados da emissão de H_2O_2 , são essenciais na regulação redox celular e da função mitocondrial (Jones, 2008). No

entanto, emissões excessivas de ERO, como H_2O_2 , podem induzir disfunções mitocondriais e celulares, que levam ao comprometimento do DNA (Martindale; Holbrook, 2002), causando senescência em muitos tipos celulares (Ben-Porath; Weinberg, 2005) e que eventualmente podem induzir disfunção cardíaca (No et al., 2018).

Em nosso estudo, o protocolo utilizado não foi capaz de promover disautonomia e/ou disfunção na contratilidade cardíaca, apesar da hipertrofia cardíaca observada. Provavelmente um tratamento mais prolongado poderia induzir à tais alterações. Outro ponto importante a ser considerado é que estudamos ratos infantis, mimetizando a terapia com OXA em humanos e a maioria dos estudos sobre disfunção da contratilidade cardíaca e/ou autonômica e EAA foram conduzidos com doses abusivas em ratos adultos (El-Mas et al., 2001; Beutel; Bergamaschi; Campos, 2005; Ward; Abdel-Rahman 2005; Ward; Abdel-Rahman, 2006; Pereira-Junior et al., 2006; Bissoli et al., 2009; Fanton et al., 2009; ; Medei et al., 2010; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013; Neves et al., 2013; Olivares et al., 2014 Lima et al., 2015; Nascimento et al., 2016; Seara et al., 2017; Melo Junior et al., 2018).

CONCLUSÃO

Apesar da OXA não alterar a contratilidade cardíaca, foram observadas modificações bioquímicas e estruturais importantes. Essas alterações parecem favorecer a homeostasia cardíaca, talvez impedindo prejuízo funcional, como o aumento da SOD1 e da expressão de proteínas que favorecem a manutenção da contratilidade cardíaca. Em contrapartida, foram observadas alterações que em longo prazo poderão afetar a função cardíaca, como a deposição de colágeno, demonstrando uma hipertrofia patológica.

Por meio de uma visão translacional, podemos inferir que embora em seres humanos o uso de OXA seja descrito como seguro para o SCV, a avaliação desse sistema é realizada, somente, por meio de parâmetros funcionais e não por avaliações estruturais e bioquímicas como realizado neste estudo, chamando a atenção para o cuidado no seu uso, principalmente em pacientes que já tenham alguma alteração da função cardíaca. Uma limitação nesta visão translacional, considerando que as alterações encontradas são subclínicas é a inviabilidade de executar protocolos tão invasivos em humanos.

REFERÊNCIAS

ABRAMOWITZ, L. K.; STICHELEN, S. O.; HANOVER, J. A. Chromosome Imbalance as a Driver of Sex Disparity in Disease. **Journal of Genomics**, v.2, p.77-88, 2014.

AGUIRRE, J.; LAMBETH J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radic Biol Med**. v. 49, p. 1342–53, 2010.

AKYUREK, M.; DUNN, R. M. Oxandrolone. *Plastic and Reconstructive Surgery*. **Safety & efficacy report**, v. 118, n. 3, p. 791-4, 2006.

ANDRADE, T. U. et al. Higher physiological doses of nandrolonedecanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. **Arch Med Res**, v. 39, p. 27-32, 2008.

ANDRADE, T.U., et al. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone decanoate induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, p. 891-897, 2011;

ANDRZEJCZAK, D.; GÓRSKA, D.; CZARNECKA, E. Influence of enalapril, quinapril and losartanon lipopolysaccharide (LPS)-induced serum concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in spontaneously hypertensive rats (SHR), **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 4, p. 437-446, 2007.

ANGELIS, K. De., SANTOS, M. S. B.; IRIGOYEN M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**. v. XIII, n. 3, 2004.

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species dependent differences in cellular mechanisms. **J. Physiol**. v. 476, p. 279–293, 1994.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J BiochemCellBiol**; v. 37, p. 961-976, 2005.

BERDAD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Ver**. v. 87, p. 245–313, 2007.

BERS, D. M. Calcium fluxes involved in control of cardiacmyocyte contraction. **Circ Res**, v. 87, p. 257-281, 2000.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-205, 2002.

BEUTEL, A. et al. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v.93, n.1, p.43-48, 2005.

BISSOLI, N. S. et al. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacol Res**, v. 59, p. 379-84, 2009.

BITRAN, D.; KELLOGG, C. K.; HILVERS, R. J. Treatment with an anabolic–androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA A receptors in the rat. **HormBehav**. v 27, n 4, p 568–83, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.7, n. 72, p. 248-54, 1976.

BRILLA, C. G. et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. **J Mol Cell Cardiol**, v. 26, p. 809-20, 1994.

BONDY, C. A. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, p. 10–25, 2007.

BOONSTRA, V. H. et al. Food intake of children with short stature born small for gestational age before and during a randomized GH trial. **Hormone Research in Paediatrics**; v. 65, n. 1, p. 23-30, 2005.

BORIS, A.; CHUCK, N. G. Relative androgenic activities of some anabolic steroids as measured by chick comb response. **Steroids**, v.9, n. 3, p. 299-305, 1967.

BORIS, A.; STEVENSON, R. H.; TRMAL, T. Comparative androgenic, myotrophic and antigonadotropic properties of some anabolic steroids. **Steroids**, v.15, n.1, p.61-71, 1970.

BRAGA, V. A.; BURMEISTER, M. A.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 295, n. 4, p. 1168-1174, 2008.

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

BRASIL, G. A. et al. Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system. **Life Sci**, v. 15, p. 137:65- 73, 2015.

BROWER, K.J.; Anabolic steroid abuse and dependence., **Curr. Psychiatry Rep.** v. 4 p. 377–387, 2002.

BRYANT, J. et al. Recombinant growth hormone for idiopathic short stature in children and adolescents. **Cochrane Database of Syst Rev**, v. 1, n. 3, p. 3-37. 2007.

CALIMAN, I. F. et al. Long-term treatment with Nandrolone Decanoate impairs mesenteric vascular relaxation in both sedentary and exercised female rats. **Steroids**. v. 120, p. 7–18, April 2017.

CAMPAGNARO, B. P. et al. Cardiac- autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. **International journal of hypertension**, v.2012, p. 1-9, 2012.

CARMO, E. C. do; et al. Anabolic Steroid Associated to Physical Training Induces Deleterious Cardiac Effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 10, p. 1836 -1848, 2011.

CARMO, C. A. et al. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. **J Appl Toxicol**. 2012; 32: 810–4.;

CHAINY, G. B.; SAMANTARA, Y. S.; SAMANTA, L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. **Andrologia**, v. 29 n. 6, p. 343-349, 1997.

CHAPLEAU, M. W.; SABHARWAL, R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail Rev*. v. 16, n. 2, p. 109 – 127, 2011.

CHIU, A. T. et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 165: 196-203.

COHEN, P. et al. Consensus Statement on the Diagnosis and Treatment of Children with Idiopathic Short Stature: A Summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93 n. 11, p. 4210-4217. nov. 2008

COHN, J.N.; FERRARI, D.; SHARPE, N. Cardiac Remodeling - Concepts and Clinical Implications: A Consensus Paper From an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569-582, 2000.

DEMLING, R. H.; ORGILL, D. P. The Anticatabolic and Wound Healing Effects of the Testosterone Analog Oxandrolone After Severe Burn Injury. **Journal of Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 12-17, 2000.

DENG, Q. et al. Non-Genomic Action of Androgens is Mediated by Rapid Phosphorylation and Regulation of Androgen Receptor Trafficking. **Cell PhysiolBiochem**. v. 43, n. 1, p. 223-236, 2017.

DENNISTON, A. Turner 's Syndrome. **Lancet**; v. 358, p. 2169-70, 2001

DU TOIT, E. F., ROSSOUW, E.; VAN ROOYEN, J.; LOCHNER, A. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury. **Cardiovasc J South Afr**. v.16, p. 21–8, 2005.

EL-MAS, M. M.; et al. Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 38, p. 754-763, 2001.

ELSHEIKH, M.; CONWAY, G. S. The impact of obesity on cardiovascular risk factors in Turner's syndrome. **Clin Endocrinol**, v. 49, p. 447-50, 1998.

ELSHEIKH, M.; CONWAY, G. S.; WASS, J. H. Medical problems in adult women with Turner's syndrome. **Ann Med**, v. 31, p. 99-105, 1999.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 513-556, 2000.

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, 2009.

FERRARIO, C. M.; STRAWN, W. B. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. **American Journal of Cardiology**, v. 98, p. 121-128, 2006.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. **J Leukoc Biol**; v. 65, p. 337-40, 1999.

FISCHER, W. H. et al. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. **Mutagenesis**. v. 16, p. 209-12, 2001.

FRANK, K. F. et al. Sarcoplasmic reticulum CaATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 20-27, 2003.

FRANKENFELD, S. P. et al. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male wistar rats. **PLoS One**. v. 16, n. 9, p. e102699. 2014.

FRANQUNI, 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. 379-385, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA Approved drug products**.

Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=OXANDROLONE>> Acesso em: 10 de abril de 2018.

FOX, M.; MINOT, A.S.; LIDDLE, G. W. Oxandrolone: a potent anabolic steroid of novel chemical configuration. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 22, p. 921-4, 1962.

FOZARD, J. R. Mechanism of the hypotensive effect of Ketanserin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 4, p. 829-838, 1982.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. v. 15, p. 1583–606, 2011.

GAO, W. D.; LIU, Y.; MARBAN, E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle: implications for the mechanism of stunned myocardium. **Circulation**. v. 94, p: 2597–604, 1996.

GASPARO, M. de. et al. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3 p. 415-72, 2000.

GROKETT, B. The effects of an anabolic steroid (oxandrolone) on reproductive development in the male and female rat. **Dissertation (Doctor of Philosophy - Exercise Science)** - Faculty of the graduate school university of southern California, 1992

HALL, R. C. W; HALL, R. C. W. Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. **South Med J**, v. 98, n. 5, p. 550-555, 2005.

HOCKMAN, J. S.; BULKLEY, B. H. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. **Circulation**.; v. 65, n. 7, p. 1446-50, 1982.

HOLLAND-HALL. Performance-enhancing substances: is your adolescent patient using? **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 54, p. 651–662, 2007.

HUIJING, X. et al. Brain ACE2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. **Circ Res**. v. 113, n. 9, p. 1087 – 1096, 2013

ICHIHARA, S. et al. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation*, v. 104, p. 346-51, 2001.

IRIGOYEN, M. C. et al. Fisiopatologia da hipertensão arterial: o que avançamos? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.1, p. 20-45, 2003.

JOHNSTON, C.I. et al. The tissue renin-angiotensin system and its functional role. **Clinical and Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 19, p. 1-5, 1992.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 295, p. 849-868, 2008.

JOSS, E. E.; SCHMIDT, H. A.; ZUPPINGER, K. A. Oxandrolone in constitutionally delayed growth: a longitudinal study up to final height. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 69, p. 1109–1115, 1989.

JUNG, M. P. et al. Revisitando o desvendamento da etiologia da síndrome de Turner. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 16, n. 2, p. 361-376, 2009.

KLIPPEL, B. F. Efeitos do kefir sobre o tônus autonômico cardíaco e controle barorreflexo da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. **Tese (Doutorado)**. PPGCF/UFES, Vitória, 2016.

KOUSTENI, S. et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 719-30, 2001.

KRAYER, O. The history of the Bezold-Jarisch effect NaunynSchmiedeberts Arch Exp PatholPharmakol, v. 240, p. 361- 368, 1961.

KUHN, C. M. Anabolic Steroids. **Recent. Prog. Horm. Res.**, New York, v.57, p. 411 - 434, 2002.

LAMPIT, M.; HOCHBERG, Z. Androgen therapy in constitutional delay of growth. **Horm Res**, v. 59, p. 270–275, 2003.

LANE, H. A. et al. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 36, p. 483– 488, 2006

LEASK, A. Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis TGF β , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation. **Circulation Research**, v. 106, p. 1675-1680, 2010.

LENNON, H. D.; SAUNDERS, F.J. Anabolic activity of 2-oxa- 17^a-methylidihydrotestosterone (oxandrolone) in castrated rats. **Steroids**, v. 4, p. 689-97, 1964.

LEIFHEIT-NESTLER, M. et al. Fibroblast growth factor 23 is induced by an activated renin–angiotensin–aldosterone system in cardiac myocytes and promotes the pro-fibrotic crosstalk between cardiac myocytes and fibroblasts. **Nephrol Dial Transplant**, v. 33, p. 1722–1734, 2018.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol**; v. 287, p. 1014–30, 2004.

LIMA, E. M. et al. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: response to resistance training in rats. **Can.J. Physiol. Pharmacol.** V. 93, n. 11, p. 1–7, 2015.

LOSCALZO, M.L. et al. Association between fetal lymphedema and congenital cardiovascular defects in Turner syndrome. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, p. 732-5, 2005.

LUCA, F. de. et al. Management of Puberty in Constitutional Delay of Growth and Puberty. International workshop on Management of Puberty for Optimum Auxological Results, **Journal of Pediatrics**, v. 14, p. 953-957, 2001.

MAIOR, A. S. et al. Cardiac autonomic dysfunction in anabolic steroid users. **Scand J Med Sci Sports**, v. 23, n. 5, p. 548-55, 2013.

MARQUES NETO, S. R. et al. The blockade of angiotensin AT1 and aldosterone receptors protects rats from synthetic androgen-induced cardiac autonomic dysfunction. **Acta physiologica**, v. 208, n. 2, p. 166-117, 2013.

MARSH, J. D. et al. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation**, v.98, p.256-261, 1998.

MARTINDALE, J. L. HOLBROOK N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J CellPhysiol**. v.192, p. 1-15, 2002.

MATSUBARA, B. B; ZORNOFF, L. A. M. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. **Arq Bras Cardiol**, v. 64, p. 559-63, 1995.

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, 2010.

MELO JUNIOR, A. F. et al. Nandrolone alter left ventricular contractility and promotes remodelling involving calcium-handling proteins and renin-angiotensin system in male SHR. **Lfs**. doi:10.1016/j.lfs.2018.07.041

MENGAL, V. Efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a sensibilidade barorreflexa e estresse oxidativo de ratos com hipertensão renovascular. **Dissertação (Mestrado)**. PPGCF/UFES, Vitória, 2012.

MENKE, L.A., et al. The effect of oxandrolone on voice frequency in growth hormone-treated girls with Turner syndrome. **J Voice**, v. 25, n. 5, p. 602-10, 2010.

MENTZ, R. J. et al. Clinical characteristics, response to exercise training, and outcomes in patients with heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: Findings from Heart Failure and A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise TraiNing (HF-ACTION). **American Heart Journal Volume**, v. 165, n. 2, p. 193–199, 2013.

MILL, J. G.; VASSALO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev Bras Hipertens**. v. 8, p. 63-75, 2001

MITSUSHIMA, D. et al. Gonadal steroid hormones maintain the stress-induced acetylcholine release in the hippocampus: simultaneous measurements of the extracellular acetylcholine and serum corticosterone levels in the same subjects. **Endocrinology**, v. 2, n. 149, p. 802-811, 2008

MIYAKODA, G. et al. Beta-Adrenergic regulation of contractility and protein phosphorylation in spontaneously beating isolated rat myocardial cells. **J Biochem**. v. 102, p. 211-224, 1987.

MOORE, D. C. et al. Studies of anabolic steroids. Effects of prolonged oxandrolone administration on growth in children and adolescents with uncomplicated short stature. **Pediatrics**, v. 58, p. 412-22, 1976.

NASCIMENTO, A. M. do. et al. SERCA2a and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p.22–30, 2016.

NASCIMENTO, J. H.; MEDEI, E. Cardiac effects of anabolic steroids: hypertrophy, ischemia and electrical remodelling as potential triggers of sudden death. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, n. 5, p. 425-9, 2011.

NATHWANI, N. C. et al. The influence of renal and cardiovascular abnormalities on blood pressure in Turner syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 52, p. 371-7, 2000.

NEVES, V.J. et al. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β -adrenergic receptors. **Life Sciences**; v. 92, nº 20-21, p. 1029-1035, 2013.

NO, M. H. et al. Effects of aging on mitochondrial hydrogen peroxide emission and calcium retention capacity in rat heart. **J ExercRehabil.** v.14, n. 6, p. 920-926, 2018.

OIGMAN, W.; NEVES, M. F. T. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. **RevBrasHipertens**, v. 3, p. 261-7, 2000.

OLIVARES, E. L. et al. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. **PhysiolBehav.** 2014 Mar 14; 126:15-24.

ORBAÑANOS, I. R. et al. Turner syndrome: From birth to adulthood. **Endocrinología e Nutrición**, v. 62, n. 10, p. 499-506, 2015.

ORR, R.; SINGH, M. F. The Anabolic Androgenic Steroid Oxandrolone in the Treatment of Wasting and Catabolic Disorders. **Drugs**, v. 64, n. 7, p. 725-750, 2004.

PAPPO, R.; JUNG C. J. 2-Oxasteroids: a new class of biologically active compounds. **Tetrahedron Lett.** v. 9, p. 365 – 371, 1962.

PARKS R. J.; HOWLETT, S. E. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Arch.*, v.465, n.5, p.747-63, 2013.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews Published**, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PAXTON, W. C. et al. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II at 1 receptor. **Am J Physiol**, v. 264, p. 989-95, 1993.

PEY, A.; SABORIDO, A.; BLAZQUEZ, I.; DELGADO, J.; MEGIAS, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 87, p. 269–277, 2003.

PEREIRA JUNIOR, P. P. et al. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 96, n. 5, p. 487-494, 2006.

PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G. J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovasc Res**. v. 77, n. 2, p. 265-73, 2008.

POPE, H. G. et al. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: Current best estimates. **The American Journal on Addictions**, v. 23, n. 4, p. 371–377, 2013.

RANKE, M. B. Treatment of children and adolescents with idiopathic short stature. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, p. 325–334, 2013.

REAGAN-SHAW, S.; Nihal, M.; Ahmad, N.; Dose translation from animal to human studies revisited, **FASEB J**. v. 22, p. 659–661, 2007.

RIEZZO, I. et al. Anabolic Steroid - and Exercise - Induced Cardio-Depressant Cytokines and Myocardial β 1 Receptor Expression in CD1 Mice. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.12, n. 2, p. 275-84, 2011.

ROCHA, I. et al. Enhancement of carotid chemoreceptor reflex and cardiac chemosensitive reflex in the acute phase of myocardial infarction of the anesthetized rabbit. **Basic Res Cardiol**, v. 98, n. 3, p. 175 – 180, 2003.

ROCHA, V. M. et al. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. **Stress**; v 10, n 4, p 326–31, 2007.

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 CircPhysiol**. v. 293, n.6, p. H3575-83, 2007.

ROSENFELD, R. G. The molecular basis of idiopathic short stature. **Growth Hormone IGF Res**, v.15, p. S3-S5, 2005.

ROSS, J. L. et al. Effects of Treatment with Oxandrolone for 4 Years on the Frequency of Severe Arithmetic Learning Disability in Girls with Turner Syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 5, p. 714-720, 2009.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. **Circulation Research**, v. 73, n. 3, p. 413-423, 1993.
SAENGER P. Turner syndrome. **N Engl J Med**, v. 335, p. 1749-54, 1996.

SALMOIRAGHI, G.C.; PAGE, I. H.; McCUBBIN, J. W. Cardiovascular and respiratory response to intravenous serotonin in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 118, p. 477-481, 1956.

SAS, T. C. J. et al. Safety and Efficacy of Oxandrolone in Growth Hormone-Treated Girls with Turner Syndrome: Evidence from Recent Studies and Recommendations for use. **Horm Res Paediatr**, v. 81, n. 5, p. 289-97, 2014.

SASAYAMA, S.; MATSUMORI, A.; KIHARA, Y. New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure. **Cardiovasc. Res**, v. 42, n. 3, p. 557–564, 1999.

SCHANZER, W. Metabolism of anabolic steroids. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.42, n.7, p. 1001 – 1020, 1996.

SCHROOR, E. J. et al. The effect of prolonged administration of an anabolic steroid (oxandrolone) on growth in boys with constitutionally delayed growth and puberty. **Eur J Pediatr**, v. 154, p. 953–957, 1995.

SCHWARTZ, N. et al. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. **Biochim Biophys Acta**. Sep;1863(9):2289-98, 2016.

SEARA, F. A. C. et al. Administration of anabolic steroid during adolescence induces long-term cardiac hypertrophy and increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult Wistar rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 171, p. 34-42, 2017.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, v. 23, nº 9, p. 1355–1390, 2001.

SHEN, J.; O'BRIEN, D.; XU, Y. Matrix metalloproteinase-2 contributes to tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in cultured rat cardiac myocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 347, n. 4, p. 1011–1020, 2006.

SILVA, I. C. M. Efeitos do treinamento físico aeróbico nas adaptações hemodinâmicas, autonômicas e morfofuncionais cardíacas da hipertensão espontânea: influência do barorreflexo. 2010. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

SRETENOVIC, J. et al. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 5, p. 429-437, 2018.

ST JOHN SUTTON M. et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after myocardial infarction: the protective effects of captopril. **Circulation**, v. 89, p. 68-75, 1994.

SUZUKI, Y. et al. Inflammation and angiotensin II. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 35, n. 6, p. 881–900, 2003.

TANNO A. P. et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. **Life**

Science. v. 89, p. 631-637, 2011.

TIMMERMANS, P. B. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol Rev**, v. 45, n. 2, p. 205-51, 1993.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, n. 8, p. 1263–73, 2004.

TRAN H. A.; SGCHRWARTZBARD A.; WEINTRAUB H. S. Role of RAAS inhibition in the prevention of cardiovascular disease. **Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.** v. 4, p. 279-88, 2011.

TSITSIMPIKOU, C. et al. Nephrotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration, **Toxicol. Lett.** V. 259, p. 21–27, 2016.

TURILLAZZI E. et al. Side effects of AAS abuse: an overview. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, n. 5, p. 374-89, 2011.

TURNER, H. H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. **Endocrinology**, v. 23, n. 5, p. 566-574, 1938.

VALLOTON, M. B. The renin-angiotensin system. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 41-76, 1987.

VASQUEZ, E. C. Contribution of the cardiopulmonary reflex to the cardiovascular regulation in normal and pathophysiological states. **Braz J Med Biol res**, v. 27, p. 1049-1064, 1994.

VASQUEZ, E. C.; PEOTTA V. A.; MEYRELLES, S. S. Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 635-46, 2012.

VELASCO, I. et al. Intracellular cAMP increases during the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of rat. *European journal of pharmacology*, Amsterdam, v. 438, p. 45-52, 2002.

VOLDERS, P. G. A. et al. Interstitial collagen is increased in the noninfarcted myocardium after myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, p. 1317-23, 1993.

YOKOYAMA, T. et al. Tumor necrosis factor-alpha provokes hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, Dallas, v. 95, n. 5, p. 1247- 1252, 1997.

WANG, M. et al. Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. *J Am Coll Cardiol*. v. 41, p. 820-6, 2003.

WANG, M., et al. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 288, p. 221–226, 2005.

WARD, G. R.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Effect of testosterone replacement or duration of castration on baroreflex bradycardia in conscious rats. **BMC Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 6, 2005.

WARD, G. R.; ABDEL- RAHMAN, A. A. Orchirctomy or androgen receptor blockade attenuates baroreflex-mediated bradycardia in conscious rats. **BMC Pharmacol**, v. 23, n. 6, p. 2, 2006.

WEBER, K. T.; BRILLA, C. G.; JANICKI, J. S. Myocardial remodeling and pathological hypertrophy. **Hosp. Pract**, v. 26, p. 73–80, 1991.

WILSON, D. M. et al. Carbohydrate and lipid metabolism in Turner syndrome: effect of therapy with growth hormone, oxandrolone, and a combination of both. **J Pediatr**, v. 112, n. 2, p. 210-17, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Gender and genetics: Genetic components of sex and gender. Disponível em: [http://www.who.int/genomics/gender/en/index1.html#Turner syndrome](http://www.who.int/genomics/gender/en/index1.html#Turner%20syndrome). WHO 2016. Acessoem: 01 de setembro de 2016.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. The renin–angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 838–849, 1999.

ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. Cardiovascular reflexes and hypertension. **Hypertension**, v. 18, p. 5, 1991.

ZORNOFF, L. A. et al. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 92, n. 2, p. 157-164, 2009.