IMPACTO DO TRATAMENTO COM OXANDROLONA NAS FUNÇÕES CARDÍACA E RENAL DE ANIMAIS JOVENS

Silas Nascimento Ronchi

TESE DE DOUTORADO EM CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PPGCF
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
VITÓRIA, MARÇO DE 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2017142451

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "impacto do tratamento com oxandrolona nas funções cardíaca e renal de animais jovens", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Silas Nascimento Ronchi, no dia 09 de fevereiro de 2022, às 08h00, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 09 de março de 2022.

Profª. Drª. Nazaré Souza Bissoli
(Orientadora)

Profª. Drª. Silvana Meyrelles
(Membro Interno)

Profª. Drª. Ana Raquel Medeiros
(Membro Interno)

Profª. Drª. Gláucia Rodrigues de Abreu
(Membro Interno)

Profª. Drª. Girlandia Alexandre Brasil Amorim
(Membro Externo)

Ronchi, Silas Nascimento, 1986

Impacto do tratamento com oxandrolona nas funções cardíaca e renal de animais jovens

82 p., 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2022)

Orientadora: Profª. Drª. Nazaré Souza Bissoli
Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.”

HENRY FORD

Dedico essa tese à minha família e aos amigos
incentivadores que mesmo no momento de escuridão
deram seu melhor para que eu pudesse chegar até aqui e
ainda me incentivaram a não parar ou desistir.

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

1.1. OXANDROLONA 18

1.2. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL E PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE 20

1.3. FUNÇÃO RENAL 23

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO e SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA 25

2. OBJETIVO 27

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27

3. MÉTODOS 28

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS 28

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS 28

3.3. AVALIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO 28

3.4. AVALIAÇÃO DA HEMODINÂMICA CARDÍACA 29

3.5. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL 30

3.6. ANÁLISES HISTOLÓGICAS 32

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 33

3.8. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO 34

3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT 35

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 35

4. RESULTADOS 37

4.1. DADOS PONDERAIS 37

4.2. TÔNUS AUTONÔMICO 38

4.3. DADOS HEMODINÂMICOS 39

4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO VENTRICULO ESQUERDO 41

4.5. ANÁLISE DE WESTERN BLOT (SERCA2a, PLB, p-PLB, NCX e ECA) 43

4.6. ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO 45

4.7. FUNÇÃO RENAL.....46

4.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA RENAL 47

4.9. ESTRESSE OXIDATIVO RENAL 49

5. DISCUSSÃO.....50

6. CONCLUSÕES.....59

7. REFERÊNCIAS 60

8. APÊNDICE 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do tratamento com OXA sobre dados biométricos, na relação peso VE (mg) / Comprimento tíbia (cm) e níveis de pressão arterial média, sistólica e frequência cardíaca..... 37

Tabela 2: Efeitos do tratamento com OXA sobre parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo 39

Tabela 3: Dados histológicos dos VE dos animais tratados com OXA..... 41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais vias de síntese de hormônios esteróides humanos..... 16

Figura 2: Possiveis alterações estruturais que influenciam a expressão das atividades androgênicas e anabólicas dos diversos EAA..... 18

Figura 3: Resultado das análises de tônus autonômico. A: variação da frequência cardíaca frente ao bloqueio com a atropina..... 38

Figura 4: Parâmetros hemodinâmicos..... 40

Figura 5: Efeitos da Oxandrolona em diferentes doses no remodelamento cardíaco ventricular esquerdo. É observado hipertrofia em ratos Wistar machos..... 42

Figura 6: Análise histológica da deposição de colágeno cardíaco..... 42

Figura 7: Análises representativas de Western blot com os valores densidométricos associados (normalizados para GAPDH)..... 43

Figura 8: Análise representativa de Western blot com os valores densidométricos associados (normalizados para GAPDH)..... 44

Figura 9: Análise de componentes do estresse oxidativo..... 45

Figura 10: Análises representativas da influência do tratamento com OXA sobre a função renal..... 46

Figura 11: Avaliação histomorfológica em ratos machos CON, L-OXA D e HD-OXA. Seções H&E representativas dos rins (A) CON, (E) L-OXA e (I) H-OXA... 48

Figura 12: Análise de componentes do estresse oxidativo em tecido renal..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGII – Angiotensina II
AOPP – Produtos da Oxidação Avançada de Proteínas
CAT – Catalase
DN – Decanoato de nandrolona
DRC – Doença renal crônica
EAA – Esteroides anabólicos androgênicos
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ERO – Espécie reativa de oxigênio
FC – Frequência Cardíaca
IC – Insuficiência Cardíaca
NAPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCX – Trocador sódio-cálcio
OS – Picrosirius
OXA – Oxandrolona
PA – Pressão arterial
PAD – Pressão arterial diastólica
PAM – Pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PLB – Enzima Fosfolambam
p-PLB – Enzima Fosfolambam fosforilada
PSG – Picrosirius red glomerular
PST – Picrosirius red tubular
PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
SOD – Enzima Superóxido Dismutase
SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona
TAU – Tempo de relaxamento isovolumétrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFG – Taxa de Filtração Glomerular

RESUMO

RONCHI, S.N. **Impacto nas funções cardíaca e renal de animais jovens tratados com oxandrolona.** Tese (Doutorado) Universidade Federal Do Espírito Santo (UFES), Programa De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2022.

A oxandrolona (OXA), um análogo sintético da testosterona, e é utilizado na prática clínica devido a maior parte dos seus efeitos serem anabólicos e pouco androgênicos, por isso uso abusivo para fins estéticos se disseminou. Tendo em vista essa problemática e a escassa literatura sobre os efeitos dessa droga frente a parâmetros renais esse trabalho tem por objetivo analisar a influência do tratamento com OXA sobre a função contrátil cardíaca, tônus autonômico e função renal de ratos jovens. Para isso animais com 4 semanas de idade foram separados em 3 grupos experimentais (n=6 cada). Grupo Controle (CON): recebeu 0,1 mL de Carboximetilcelulose (CMC, 0,5%), Grupo L-OXA (Oxandrolona 2,5 mg/kg/dia) e grupo H-OXA (Oxandrolona 37,5 mg/kg/dia). A administração foi feita por via oral (gavagem), diariamente por 4 semanas. Após o período de tratamento os animais foram anestesiados e para a avaliação da função contrátil houve a cateterização da artéria carótica direita, sendo esse cateter inserido até o ventrículo esquerdo para a aferição dos parâmetros de contratilidade. Para a avaliação do tônus autonômico houve a cateterização de artérias e veias femorais de outros grupos de animais tratados e o mesmo foi estimado através de bloqueadores farmacológicos seletivos. Para esses ensaios foram utilizados somente os grupos CON e H-OXA. Para a avaliação da função renal os animais dos grupos CON, L-OXA e H-OXA onde após o tratamento tiveram a traqueia, artéria e veia femoral e bexiga cateterizadas para facilitar a respiração, coleta de sangue, infusão de inulina e paraaminohipurato e coleta de urina, respectivamente. Através de coletas seriadas de sangue e urina foram calculadas as taxas de filtração glomerular (TFG), o fluxo plasmático renal (FPR), fluxo sanguíneo renal (FSR) e resistência vascular renal (RVR). Tecido cardíaco foram reservados para estudo de expressão das proteínas de mobilidade de Calcio e estudos histológicos e tecido renal foi encaminhado para análises histológicas e de AOPP e TBAR's. Não houve diferença nas análises do tônus autonômico, entretanto, a PSVE foi aumentada no grupo H-OXA. O tratamento não foi capaz de promover mudanças na +dP/dt max e -dP/dt min. O mesmo foi constatado quando analisado o Tau. A análise por Western Blot revelou que a expressão da proteína SERCA2a aumentou no grupo o H-OXA, não havendo diferença nas demais proteínas de contratilidade analisadas. Houve aumento nas razões p-PLB/PLB e SERCA2a/PLB indicando atividade das proteínas envolvidas. Houve ainda um expressivo aumento na expressão proteica da ECA. Para a função renal o tratamento com OXA reduziu o clearance de inulina representa a influência negativa do tratamento sobre a TFG. Sem alterar os demais parâmetros analisados. A histologia revelou hipertrofia cardíaca e extensa deposição de colágeno tanto no tecido cardíaco quanto renal. Estima-se que as alterações encontradas tem participação direta do sistema renina angiotensina tecidual que induz a geração de estresse oxidativo, provocando alterações subclínicas do ponto de vista cardíaco e um extenso prejuízo na função renal em todas as doses estudadas.

Palavras chave: Oxandrolona, contratilidade, função renal, colágeno, estresse oxidativo

ABSTRACT

RONCHI, S.N. **Impact on cardiac and renal function of young animals treated with oxandrolone.**Tese (Doutorado) Universidade Federal Do Espírito Santo (UFES), Programa De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2022.

Oxandrolone (OXA), a synthetic analogue of testosterone, is used in clinical practice because most of its effects are anabolic and low androgenic, so its abuse for aesthetic purposes has spread. In view of this problem and the scarce literature on the effects of this drug on renal parameters, this study aims to analyze the influence of OXA treatment on cardiac contractile function, autonomic tone and renal function in young rats. For this, 4-week-old animals were separated into 3 experimental groups (n=6 each). Control Group (CON): received 0.1 mL of Carboxymethylcellulose (CMC, 0.5%), L-OXA Group (Oxandrolone 2.5 mg/kg/day) and H-OXA Group (Oxandrolone 37.5 mg/kg /day). The administration was made orally (gavage), daily for 4 weeks. After the treatment period, the animals were anesthetized and, for the evaluation of contractile function, the right carotid artery was catheterized, and this catheter was inserted up to the left ventricle for the measurement of contractility parameters. For the evaluation of the autonomic tone, there was the catheterization of femoral arteries and veins of other groups of treated animals and the same was estimated through selective pharmacological blockers. For these assays, only the CON and H-OXA groups were used. For the evaluation of renal function, the animals in the CON, L-OXA and H-OXA groups, where after treatment, the trachea, femoral artery and vein and bladder were catheterized to facilitate breathing, blood collection, inulin and paraaminohippurate infusion and collection of urine, respectively. Through serial blood and urine collections, glomerular filtration rates (GFR), renal plasma flow (RPF), renal blood flow (RBF) and renal vascular resistance (RVR) were calculated. Cardiac tissue was reserved for study of expression of calcium mobility proteins and histological studies and kidney tissue was referred for histological analysis and AOPP and TBAR's. There was no difference in the autonomic tone analyses, however, the LVPS was increased in the H-OXA group. The treatment was not able to promote changes in +dP/dt max and -dP/dt min. The same was found when analyzing the Tau. Western blot analysis revealed that the expression of the SERCA2a protein increased in the H-OXA group, with no difference in the other contractility proteins analyzed. There was an increase in the p-PLB/PLB and SERCA2a/PLB ratios indicating activity of the proteins involved. There was also a significant increase in ACE protein expression. For renal function, treatment with OXA reduced inulin clearance represents the negative influence of treatment on GFR. Without changing the other parameters analyzed. Histology revealed cardiac hypertrophy and extensive collagen deposition in both cardiac and renal tissue. It is estimated that the alterations found have a direct role in the tissue renin-angiotensin system that induces the generation of oxidative stress, causing sub-clinical alterations from the cardiac point of view and extensive damage to renal function at all doses studied.

Keywords: Oxandrolone, contractility, renal function, collagen, oxidative stress

1. INTRODUÇÃO

Desde o século XIX pesquisas tem se direcionado ao estudo dos andrógenos e as mesmas foram impulsionadas quando o pesquisador francês Charles-Édouard Brown-Séquard (1817–1894) fez uma autoadministração de extrato de testículo de porco, o qual relatou melhoria de desempenho em atividades cotidianas, porém com efeitos transitórios (BROWN- SÉQUARD, 1869). Adicionalmente, estudos promovidos já no início do século XX mostraram que a administração de uma substância isolada a partir de testículos de bovinos era capaz de retornar com os caracteres secundários masculinos de galos, porcos e ratos previamente castrados (GALLAGHER; KOCH, 1929).

Somente em 1935 que a substância responsável pelos efeitos acima descritos foi isolada, recebendo o nome de testosterona (DAVID et al., 1935). Mais tarde, no mesmo ano, a síntese desse hormônio foi descrita por Butenandt e Hanisch e Ruzicka e Wettstein aos quais foram atribuídos prêmio Nobel de química (BUTENANDT; HANISCH, 1935; RUZICKA; WETTSTEIN, 1935). Entretanto há relatos que Butenandt e Hanisch tiveram de declinar da honra do prêmio Nobel em virtude de pressão do governo Nazista (FREEMAN; BLOOM; MCGUIRE, 2001)

Diversos estudos foram realizados em relação a produção endógena desse hormônio e os mesmos foram evoluindo até que se estabeleceu que sua síntese, é principalmente, realizada pelas células de Leydig e sua regulação feita pelo hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante. Além disso, a quantidade de testosterona produzida pelas células Leydig está sob o controle do LH, que por sua vez regula a enzima 17β-hidroxiesteróide desidrogenase que reduz o grupamento cetônico em C17 a hidroxila, convertendo a androstenediona a testosterona conforme podemos verificar na Figura 1 que mostra com maiores detalhes as principais vias de síntese de hormônios esteróides humanos (MILLER, 1988; ZOUBOULIS; DEGITZ, 2004).

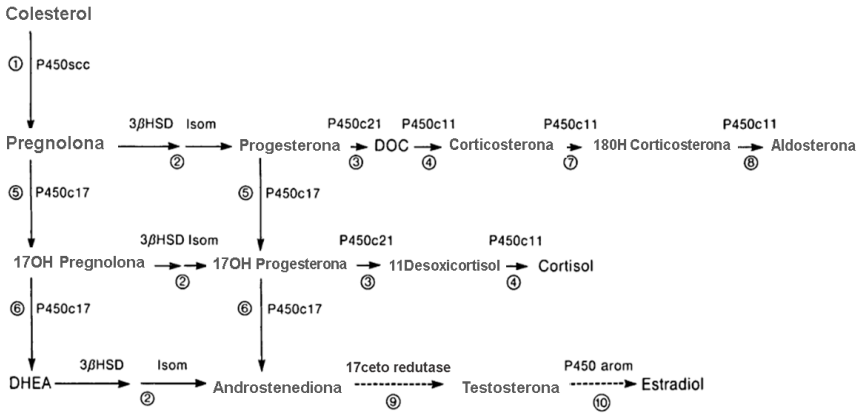


Figura 1: Principais vias de síntese de hormônios esteróides humanos. As identidades químicas das enzimas são mostradas por cada reação, e os nomes tradicionais das atividades enzimáticas correspondem aos números circulados. Reação 1: O citocromo P450scc mitocondrial medeia 20a-hidroxilação, 22-hidroxilação e cisão da ligação de carbono C20-22, um conjunto de reações tradicionalmente denominadas "20,22 desmolase". Reação 2: Uma enzima (ou enzimas) não-P450 ligada ao retículo endoplasmático medeia as atividades de 3/3-hidroxiesteróide desidrogenase e isomerase (Isom). Reação 3: P450c21 no retículo endoplasmático medeia a 21-hidroxilação. Reações 4, 7 e 8: A P450c11 mitocondrial exerce três atividades claramente distinguíveis: ll/Miidroxilação (4), 18-hidroxilação (7) e atividade de 18-metil oxidase (8). Reações 5 e 6: P450cl7 no retículo endoplasmático medeia as atividades de 17a-hidroxilase (5) e 17,20-liase (6). As reações 9 e 10 são encontradas principalmente nos testículos e ovários: 17-cetosteróide redutase, uma enzima não-P450 do retículo endoplasmático, produz testosterona (9), que pode então ser convertida em estradiol pela P450aro (10), outra enzima P450 do retículo endoplasmático mediando a aromatização do anel A do núcleo esteróide.(MILLER, 1988)

A quantidade de testosterona sintetizada é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-testicular. Quando os níveis de testosterona são baixos, o hormônio liberador de gonadotropina é liberado pelo hipotálamo, o que, por sua vez, estimula a glândula pituitária para liberar FSH e LH. Estes dois últimos hormônios estimulam o testículo a sintetizar e liberar testosterona. Com a elevação dos níveis séricos de testosterona, a mesma atua no hipotálamo em feedback negativo inibindo a gonadotropina e por consequência o LH e FSH (MILLER, 1988; SWERDLOFF; WANG; BHASIN, 1992).

Os efeitos da testosterona em seres humanos e outros vertebrados ocorrem por meio de mecanismos múltiplos: por ativação do receptor androgênico citoplasmático ou de

membrana (BENNETT et al., 2010; MCPHAUL; YOUNG, 2001), uma vez que, a testosterona livre é transportada para o citoplasma das células do tecido alvo, onde pode se ligar ao receptor androgênico, ou pode ser reduzida à 5 α -dihidrotestosterona pela enzima citoplasmática 5α-redutase. A 5 α -dihidrotestosterona liga-se ao mesmo receptor androgênico com maior afinidade do que a testosterona, de modo que sua potência androgênica é cerca de 5 vezes maior quando comparada com a testosterona. O receptor androgênico sofre uma mudança estrutural que permite que ele se mova para o núcleo da célula e se ligue diretamente a sequências de nucleotídeos específicas do DNA cromossômico. As áreas de ligação são chamadas de elementos de resposta hormonal e influenciam a atividade de transcrição de certos genes, produzindo os efeitos androgênicos (BREINER; ROMALO; SCHWEIKERT, 1986).

Desenvolveu-se, então, os Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA), que constituem numerosos compostos derivados da testosterona, que foram modificados para melhorar o anabolismo, geralmente são usados para aumentar a síntese de proteínas, o crescimento muscular e a eritropoiese (NETO et al., 2015). Alguns representantes dessa classe são de uso exclusivo parenteral, outros orais e, independentemente dos efeitos androgênicos no organismo, a terapia farmacológica com os EAA's não está restrita ao uso do andrógeno natural, nem está limitada a doses de reposição fisiológica ou seu equivalente (HANDELSMAN, 2020).

Após a descoberta dos efeitos androgênicos e da identificação química da testosterona, outras substâncias foram desenvolvidas para serem utilizadas, principalmente para manter os efeitos anabólicos desse hormônio (ORR; SINGH, 2004) e através de modificações estruturais na molécula da testosterona, várias substâncias foram desenvolvidas gerando novas classes de EAA que possuem propriedades específicas, sendo eles os esteroides 17β-alquilados (utilizados geralmente por via parenteral, com tempo de ação variável, dependendo do grupo substituinte), 17β-esterificados (maior tempo de ação, pela substituição com ácido graxo), 17α-substituídos (podem ser administrados oralmente) e esteroides com modificações nos anéis A, B e C que fornecem a esses novos fármacos diversas ações farmacológicas, dentre eles maior afinidade pelos RA e resistência à aromatização conforme demostrado pela figura 2 (TURILLAZZI et al., 2011).

Neste sentido, o abuso de andrógenos se intensificou, por meio da qual os países comunistas do Leste Europeu podiam desenvolver programas nacionais para obter vitórias de propaganda de curto prazo sobre o Ocidente nos esportes olímpicos e internacionais (FRANKE; BERENDONK, 1997)(FRANKE; BERENDONK, 1997). Essa forma de trapaça foi prontamente adotada por atletas individuais que buscavam recompensas pessoais de fama e fortuna em esportes competitivos de elite e, apesar de anos de testes e programas antidoping agressivos, os escândalos de abuso de EAA's envolvendo atletas de alto nível continuam a ser notícia de primeira página em todo o mundo (BARON; MARTIN; ABOL MAGD, 2007).

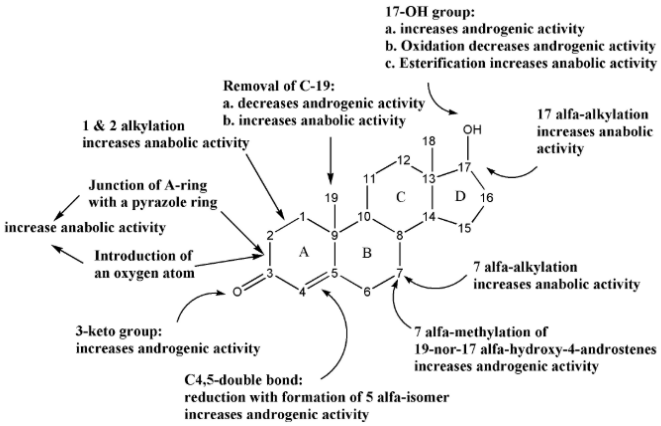


Figura 2: Alterações estruturais passiveis da molécula original de testosterona que influenciam a expressão das atividades androgênicas e anabólicas das diversas moléculas geradas.

1.1. OXANDROLONA

A oxandrolona (OXA; 17β-Hydroxy-17-methyl-2-oxa-5-androstan-3-ona) foi o EAA escolhido para nosso estudo. Ela é um esteroide 17β-alquilado, possui potente atividade anabólica e baixa atividade androgênica, sendo a razão entre a atividade anabólica/androgênica considerado ótimo, por isso sua indicação no tratamento de doenças que conferem perda no desenvolvimento muscular, como a AIDS, caquexia ou traumas extensos (DEMLING; ORGILL, 2000; ORR; SINGH, 2004).

Comentado [1]:

A alquilação no carbono C17 confere a OXA a capacidade de absorção oral, e redução dos efeitos deletérios no fígado pela alta metabolização na primeira passagem. Além

disso, a OXA possui como características farmacodinâmicas, 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, sendo seu principal metabolito a 17-epioxandrolona (AKYUREK; DUNN, 2006).

Nos Estados Unidos, a OXA é o único EAA liberado para tratamento de perda de massa grave, seja por doenças severas como AIDS, perda de peso após cirurgia, desordens neuromusculares, angioedema hereditário, hepatite alcoólica, entre outras e apesar de suas indicações terapêuticas, o principal motivo para a suspensão do OXA é o aparecimento de efeitos adversos (SAS et al., 2014). A dose recomendada para humanos é de 0,03mg/kg/dia podendo alcançar 0,06mg/kg/dia, sendo o período máximo de tratamento variante. Em revisão realizada por Sas e colaboradores (2014), a principal razão para a descontinuação do tratamento é o aparecimento de efeitos adversos, sendo o principal descrito a virilização e hisurtismo em mulheres, entretanto, não há a descrição de eventos adversos cardiovasculares importantes (MENKE et al., 2010).

Adicionalmente, há indicações do uso de OXA em meninos com baixa estatura idiopática, devido ao baixo efeito androgênico reportado para este EAA. 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).

No entanto, devido aos seus efeitos anabólicos, o uso indevido de OXA para fins estéticos é generalizado (ANGOORANI; HALABCHI, 2015; HARTGENS; KUIPERS, 2014; PIACENTINO et al., 2015), tanto por adultos como por adolescentes (HALLGREN et al., 2015; LUMIA; MCGINNIS, 2010). Geralmente, OXA causa um grande número de efeitos adversos, como espessamento da voz, clitoromegalia, crescimento de pelos faciais, alopecia, acne, aumento da libido, alterações do ciclo estral em meninas com ST. Em geral, o abuso de EAA pode promover prejuízo no sistema cardiovascular, conforme mostrado em estudos anteriores do nosso grupo (ANDRADE, Tadeu U et al., 2008; BISSOLI et al., 2009; FRANQUINI et al., 2012; MELO JUNIOR et al., 2018; NASCIMENTO, Andrews Marques do et al., 2016) e outros (DAS NEVES et al., 2013; FANTON et al., 2009; MEDEI et al., 2010; SEARA et al., 2017; THIBLIN et al., 2015; TORRISI et al., 2020). Em relação a OXA, os estudos avaliando os efeitos cardiovasculares e renais em doses terapêuticas e de

abuso são escassos e/ou inexistentes e foram objeto do presente estudo e desta forma faremos uma breve revisão sobre o controle cardiovascular a seguir.

1.2. CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL E PARÂMETROS DE CONTRATILIDADE

Por definição, a pressão arterial (PA) pode ser descrita como a força exercida pelo sangue por unidade de superfície da parede vascular, como um produto resultante da interação do débito cardíaco com a resistência vascular periférica sistêmica, podendo ser considerada como a força motriz necessária para que se mantenha a perfusão sistêmica adequada. A pressão arterial sistólica (PAS) representa a pressão máxima no interior das artérias, estando associada à sístole ventricular cardíaca, enquanto a pressão arterial diastólica (PAD) representa a menor pressão nas artérias ocasionada pela diástole ventricular cardíaca no momento em que o sangue está preenchendo as cavidades ventriculares. O fluxo de sangue através da circulação sistêmica depende, parcialmente, da diferença de pressão entre a aorta e o átrio direito (CHOBANIAN et al., 2003).

A manutenção da pressão arterial dentro de uma faixa de normalidade é consequência de variações no débito cardíaco, na resistência vascular periférica, ou de ambos. Diferentes mecanismos de controle participam não só na manutenção como na variação momento a momento dos níveis pressóricos. O entendimento dos mecanismos de regulação da pressão arterial tem apontado para uma variedade de substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de modo a garantir níveis pressóricos adequados frente às variações em diversas situações (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; KRIEGER, 1970).

A regulação efetiva da pressão arterial é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto e a longo prazo (DAMPNEY, 1994; SHEPHERD; MANCIA, 1986)(DAMPNEY, 1994; SHEPHERD; MANCIA, 1986). A curto prazo esse controle é desempenhado pelos reflexos que são originados nos barorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar que tem por papel manter a pressão arterial dentro de limites normais em períodos de segundos, utilizando um sistema de retro-alimentação realizado pelo sistema nervoso autônomo (SHEPHERD; MANCIA, 1986). Em humanos, essas terminações sensoriais da

maioria das fibras barorreceptoras estão localizadas no arco aórtico, seio carotídeo e artéria subclávia direita. Esses terminais sensoriais não são estimulados pela pressão por si, são mecanorreceptores que respondem às alterações de estiramento da parede arterial causadas pelas alterações de pressão dentro do vaso (DAMPNEY, 1994; KRIEGER, 1970; ROMANOSKY et al., 1986; SHEPHERD; MANCIA, 1986).

O controle neural é determinado em grande parte pela modulação do tono simpático dirigido ao coração e arteríolas. De forma geral pode-se relacionar o controle neural como mais eficiente nos ajustes rápidos da pressão arterial, ou seja, momento a momento, como por exemplo nas mudanças posturais, no esforço físico e no ciclo vigília-sono. A longo prazo, tanto o controle neural como hormonal estão diretamente envolvidos (AIRES, 2012).

Além das rápidas respostas neurais (segundos), o organismo também possui o controle humoral da circulação que é feito pela liberação de vários hormônios (parácrinos ou autócrinos) ou agentes químicos de ação local que participam na manutenção dos valores basais da PA, interferindo principalmente na modulação do tono arteriolar. Quando há uma queda sustentada da PA, por exemplo, irá ocorrer maior liberação de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, maior liberação de vasopressina pela neuro-hipófise e aumento dos níveis plasmáticos de renina. Este último hormônio integra o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que é um dos sistemas mais amplamente estudado pela sua grande significância. O qual está mais intimamente relacionado no controle natriurético, e consequentemente, do volume extracelular, embora também module a resistência vascular e função cardíaca (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001).

Apesar da eficiência dos mecanismos neurais e humorais para ajustes apropriados para regularem os parâmetros pressóricos em distúrbios da homeostase circulatória, como na hipertensão, esses fatores de controle, uma vez suprimidos ou hiperexcitáveis, podem contribuir para a gênese e manutenção do aumento dos níveis pressóricos.

Todos esses mecanismos estão atrelados ainda a atividade da função do coração como bomba que possui com função básica garantir a perfusão sanguínea dos tecidos periféricos e o aporte sanguíneo para os alvéolos de modo a permitir a troca gasosa. O funcionamento do ventrículo esquerdo inclui diversas etapas e eventos, já bem

descritos na literatura, que resumidamente podem ser divididos em duas fases magnas do ciclo cardíaco, como as fases de contração e relaxamento, chamados de sístole e diástole cardíaca, respectivamente. A sístole refere-se ao processo de contratilidade, que na prática demonstra o desempenho cardíaco frente a uma determinada pré-carga e pós-carga podendo ser quantificado pelas variáveis: pressão desenvolvida no ventrículo e o tempo decorrido para que se eleve a pressão intraventricular ao máximo. Essas duas variáveis são relacionadas na fórmula dP/dt, por meio da qual se obtém a variação de pressão em um determinado tempo, durante o aumento da pressão. Dessa forma o valor de pico máximo (dP/dtmax+) consiste em um índice de força do ventrículo e é considerado uma medida de contratilidade (DE MEY et al., 2001; MELO JUNIOR et al., 2018). No entanto, segundo Hamlin e Del Rio (2012) a dP/dtmáx é determinado por três fatores: (1) contratilidade miocárdica (ou seja, a velocidade de ciclagem de cabeças pesadas de miosina), (2) volume diastólico final (intensidade da ligação de Ca^{2+} à troponina-C e o número de ciclos de pontes cruzadas) e (3) pressão diastólica arterial sistêmica (o impedimento à abertura da válvula aórtica).

Assim, não se pode dizer que a contratilidade miocárdica será sempre alterada de forma diretamente proporcional a variação da dP/dtmáx, isto é, os únicos momentos em que dP/dtmáx reflete a contratilidade do miocárdio são quando os outros determinantes não são alterados ou as alterações em outros determinantes são iguais, mas opostas. No entanto é relativamente comum, principalmente em estudos farmacológicos, correlacionar o termo dP/dtmáx a contratilidade (HAMLIN; DEL RIO, 2012).

A diástole, por sua vez está relacionada a capacidade de relaxamento do ventrículo. De acordo com (DE MEY et al., 2001) a quantificação da taxa de relaxamento do ventrículo esquerdo em condições normais e patológicas é importante na avaliação da função de bomba do miocárdio. Tem-se demonstrado também que o relaxamento miocárdico prejudicado é um forte indício do início da insuficiência cardíaca (LEITE-MOREIRA; GILLEBERT, 1994; LORELL, 1991). Determinou-se também que a disfunção diastólica tem por característica o relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo de forma insuficiente, confirmada pelo aumento da constante TAU (tempo de relaxamento isovolumétrico), pela diminuição do índice dP/dt de queda da pressão do ventrículo esquerdo (dP/dtmax-) e por um aumento anormal da pressão diastólica

final do ventrículo esquerdo (VERMA e SOLOMON, 2009). Dessa forma, a avaliação da atividade ventricular esquerda pode ser realizada a partir do cálculo destes fatores (HAMLIN; DEL RIO, 2012; MELO JUNIOR et al., 2018)

É notório que o uso de EAA pode influenciar nesses parâmetros negativamente (MELO JUNIOR et al., 2018; NASCIMENTO, Andrews Marques do et al., 2016). Esses mesmos autores, descrevem que além da alteração nos parâmetros de contratilidade existe um extenso remodelamento do tecido cardíaco quando no uso de doses suprafisiológicas do EAA decanoato de nandrolona (DN). Somando a esse fato, estudos mostram que os EAA parecem exercer efeitos diretos sobre coração, por meio da ação em receptores nucleares promovendo aumento do RNAm e síntese de proteínas no miocárdio (KINDERMANN, 2006; MELCHERT; WELDER, 1995).

1.3. FUNÇÃO RENAL

Os rins desempenham um papel vital na excreção de produtos residuais e toxinas como uréia, creatinina e ácido úrico, regulação do volume do líquido extracelular, osmolalidade sérica e concentrações de eletrólitos, bem como a produção de hormônios como eritropoietina e 1,25 diidroxivitamina D e renina. A unidade funcional do rim é o néfron, que consiste no glomérulo, túbulos proximais e distais e ducto coletor. A avaliação da função renal é importante no manejo de pacientes com doença renal ou doenças que afetam a função renal. Embora as principais causas de doença renal crônica sejam a diabetes e a a hipertensão, outras causas são identificadas bloqueio do trato urinário (obstrução), certas anomalias renais (como a doença renal policística e glomerulonefrite) e as doenças autoimunes (como lúpus eritematoso sistêmico), em que os anticorpos danificam vasos sanguíneos e os canais dos túbulos. Menos identificados são os estudos sobre a ação dos EAA no rim. Encontramos estudos que mostram não alteração funcional do rim com uso de DN (BRASIL et al., 2015), enquanto testosterona aplicada no pré-natal de ratos aumentou a proteinúria (BÁBÍČKOVÁ et al., 2015)(BÁBÍČKOVÁ et al., 2015) . Ainda, DN pode aumentar o estresse oxidativo e redução de enzima antioxidante no rim (FRANKENFELD et al., 2014). (RIEZZO et al., 2014) evidenciaram que a dose empregada de DN influencia diretamente nas lesões renais observadas, associada a processo inflamatório e apoptose.

Neste sentido, no presente estudo, realizamos a avaliação da função renal e da cardíaca em ratos tratados com OXA, uma vez que, a literatura demonstra a relação entre as alterações cardíacas e renais, podendo existir mecanismos fisiopatológicos comuns(BRASIL et al., 2015; NASCIMENTO, Andrews Marques do et al., 2016). Fazendo um paralelo ao que acontece em seres humanos, a doença renal crônica (DRC) e a insuficiência cardíaca (IC) coexistem frequentemente e ambas estão associadas a alta morbidade e mortalidade(AHMED; CAMPBELL, 2008; SEGALL; NISTOR; COVIC, 2014). Estudos mostraram que existe uma associação inversa entre a função renal e o risco cardiovascular (MAFHAM et al., 2011; MATSUSHITA et al., 2010). A relação de alterações fisiopatológica entre o coração e os rins envolve diferentes vias. A DRC pode alterar a homeostase de maneira que pode diretamente prejudicar o sistema cardiovascular, em situação de hipertensão arterial ou disfunção vascular; assim como os rins e a circulação podem estar sujeitos a fatores de risco “indiretos” (por exemplo, diabetes mellitus e tabagismo). Além disso, se o paciente apresenta insuficiência cardíaca, pode piorar a DRC ao diminuir a perfusão renal, causando a ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que por sua vez pode causar inflamação e estresse oxidativo (FORTUÑO et al., 2005; LOCATELLI et al., 2003; ROUMELIOTIS; ELEFTHERIADIS; LIAKOPOULOS, 2019; TUCKER; SCANLAN; DALBO, 2015; ZALBA; FORTUÑO; DÍEZ, 2006)

A doença cardíaca estrutural é uma das principais causas de doença cardiovascular em pacientes com DRC e sua prevalência aumenta com o declínio da função renal (BAGSHAW et al., 2010; SEGALL; NISTOR; COVIC, 2014). Portanto, ao observarmos a interligação de fatores comuns a alterações no rim e no coração, estudos que avaliem tanto o coração, quanto os rins são se suma importância. Além de estudarmos a função de ambos os órgãos, outros parâmetros de interesse foram avaliados no nosso estudo, como o estresse oxidativo do tecido cardíaco e renal, e componente do SRA no coração, uma vez que, a exposição de EAA em doses de abuso em animais pode promover mudanças no equilíbrio redox e induzir estresse oxidativo(LIMA et al., 2015) e da enzima conversora de angiotensina (FRANQUINI et al., 2012).

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO e SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Nas várias condições patológicas, o estresse oxidativo desempenha papel fundamental, incluindo hipertensão, diabetes e doença renal crônica, com altos níveis de estresse oxidativo em órgãos-alvo, como coração, pâncreas, rim e pulmão. Sabe-se que o estresse oxidativo ativa a sinalização intracelular múltipla, que induz a apoptose ou supercrescimento celular, levando à disfunção orgânica. Como tal, acredita-se que o controle do estresse oxidativo seja eficaz na proteção contra danos nos órgãos, e a medição do status do estresse oxidativo pode servir como um biomarcador em diversos estados de doença (CHANNON; GUZIK, 2002; OGURA; SHIMOSAWA, 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) são derivados reativos onipresentes do metabolismo do O_2 encontrados no meio ambiente e em todos os sistemas biológicos. Essas podem ser produzidas nas mitocôndrias, como um subproduto da produção de ATP usando cadeia de transporte de elétrons ou ainda pelas enzimas na matriz celular ou membrana as quais incluem a xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, NADH/NADPH oxidase(OGURA; SHIMOSAWA, 2014). Alguns subprodutos celulares gerados por essas enzimas, quando em maior concentração, podem ser considerados nocivos, por possuírem potencial para danificar lipídios, proteínas e DNA (TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, 2004).

No entanto, as ERO's não são apenas consequências tóxicas do metabolismo celular, mas também participantes essenciais na sinalização e regulação celular, levando a mudanças na transcrição gênica e na síntese de proteínas e, consequentemente, na função celular. Sendo as EROS mais importantes citadas como o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), superóxido ($O_2^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) as quais são atribuídas, como já dito, a papéis fisiológicos, atuando como segundos mensageiros que regulam várias cascatas de transdução de sinal (CHENG et al., 2003; TOUYZ, Rhian M.; BRIONES, 2011). Essas moléculas, em detrimento do seu poder lesivo, são fortemente regulados por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa (GPX) e outras moléculas como vitaminas que possuem papel antioxidantes (CHANNON; GUZIK, 2002; STRÅLIN et al., 1995).

O estresse oxidativo, então, é um distúrbio metabólico caracterizado pelo aumento da produção das ERO's ou a redução no sistema enzimático antioxidante (LIMA et al.,

2020) e esse aumento está potencialmente associado a um defeito na função contrátil cardíaca em um cenário patológico (GRIENDLING; FITZGERALD, 2003; OGURA; SHIMOSAWA, 2014; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, 2004).

O SRAA é um dos sistemas que conecta o rim e a circulação sanguínea, demonstrando assim a importância do rim no controle da pressão sanguínea (CROWLEY; COFFMAN, 2012)(CROWLEY; COFFMAN, 2012) e estudos mostram que o estresse oxidativo pode ser estimulado por esse sistema (CARLSTRÖM et al., 2010; LAI et al., 2012; MACCARTHY et al., 2001). Um dos principais peptídeos efetores do SRA, a angiotensina II (ANGII), interagindo com o receptor do tipo AT1 estimula a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase ligada à membrana, estimulando a produção de EROs em tecido cardíaco e está sendo associado a influencias negativas da função contrátil cardíaca (MACCARTHY et al., 2001). Assim, a ANGII quando aumentada sua ação, eleva a produção do radical superóxido, ao qual está associado ao remodelamento vascular e cardíaco e ao aumento da resistência pré-glomerular, ambos implicados na patogênese da doença renal e cardiovascular (CARLSTRÖM et al., 2010; LAI et al., 2012).

O aumento do estresse oxidativo no rim pode ser relacionado à perda da função renal e à modalidade de terapia renal substitutiva (hemodiálise ou diálise peritoneal) em pacientes com DRC terminal. Assim, tanto a maior produção de ROS quanto a diminuição da depuração de substâncias pró-oxidantes no contexto da disfunção renal, juntamente com o comprometimento da defesa antioxidante, são responsáveis pelo meio pró-oxidante que caracteriza a DRC (LOCATELLI et al., 2003; ROUMELIOTIS; ELEFTHERIADIS; LIAKOPOULOS, 2019). O estresse oxidativo pode estar presente mesmo nos estágios iniciais da DRC com aumento da produção de radicais livres (FORTUÑO et al., 2005; ZALBA; FORTUÑO; DÍEZ, 2006) e aumenta com a progressão da doença (SMALL et al., 2012).

Como supracitado, os estudos avaliando os efeitos cardiovasculares e renais da OXA em doses terapêuticas e de abuso são escassos e/ou inexistentes e baseado nos dados anteriores do nosso grupo e de outros pesquisadores, levantamos a hipótese de que esse EAA leva a alterações funcionais, estruturais e moleculares no coração e rim de ratos.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da Oxandrolona sobre os parâmetros cardiovasculares e renais de ratos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com Oxandrolona no(a):
Pressão sistólica e Frequência cardíaca no final do tratamento;
Contratilidade cardíaca: pressão intraventricular esquerda (PSVE), TAU e Derivadas temporais de pressão (dp/dt);
Tônus autonômico;
Função renal;
Variação do peso corporal e na relação Ventrículo esquerdo (VE) e rim esquerdo (RE) em relação à tíbia;
Remodelamento Cardíaco e renal: parâmetros histológicos e deposição de colágeno;
Componente do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)
Estresse Oxidativo.

3. MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos machos (*Rattus novergicus*) com 4 semanas de idade e peso variando entre 80-90 g foram mantidos em gaiolas coletivas, com acesso a água e comida *ad libitum*, ciclo claro escuro de 12h, umidade e temperatura controlados. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem-estar animal da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES: 10/2016) e foram realizados de acordo com o preconizado pelo National Institutes of Health (NIH).

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 3 grupos experimentais para estudo da função renal, que foram dividos em Grupo Controle (CON): Os animais receberam 0,1 mL de Carboximetilcelulose (CMC, 0,5%), grupo L-OXA (Oxandrolona 2,5 mg/kg/dia) (Manipula, farmácia de manipulação, ES, Brasil) e grupo H-OXA (Oxandrolona 37,5 mg/kg/dia) (Manipula, farmácia de manipulação, ES, Brasil) (adaptado deMENKE et al., 2011). Para o estudo da função cardíaca tivemos 02 grupos, animais receberam OXA (Oxandrolona 37,5 mg/kg/dia) e o grupo Controle (CON). A administração foi feita por via oral (gavagem), diariamente por 4 semanas. No Grupo L-OXA somente apresentamos os dados de função renal, uma vez que os dados da função cardíaca fizeram parte de outro estudo.

3.3. AVALIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO

Após o tratamento, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Syntec, Santana do Parnaíba, SP, Brasil) e xilasina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil)

(100/10 mg/kg, i.p.) e submetidos ao procedimento de cateterização da artéria e veia femoral. O protocolo é o descrito por Brasil et al. (2015) e consiste no isolamento da artéria e veia femorais, seguido da inserção de uma cânula de polietileno (PE10) acoplada a uma cânula de diâmetro maior (PE50), preenchidas por solução salina (NaCl 0,9%). 24 horas após o procedimento cirúrgico, com os animais acordados, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (modelo MP100-CE; Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). Dados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca basal (FC) foram coletados antes da infusão das drogas.

O tônus autonômico cardíaco foi estimado através de bloqueadores farmacológicos seletivos dos receptores muscarínicos e os β1- receptores adrenérgicos em animais conscientes (KLIPPEL *et al.,* 2016). O tônus parassimpático cardíaco foi verificado pela alteração da FC basal 30 min após uma única injeção de metilatropina (2 mg/kg, iv). Transcorrido esse tempo, foi administrado atenolol (4 mg/kg, iv) que, após 30 min dados coletados foram considerados referentes a FC intrínseca (marca-passo). 24 h após esse procedimento, a sequência das injeções foi oposta, e o tônus simpático cardíaco foi estimado pela mudança na FC basal 30 min após a administração do atenolol, e a FC intrínseca foi estimada em 30 min sob o duplo bloqueio.

3.4. AVALIAÇÃO DA HEMODINÂMICA CARDÍACA

Animais experimentais (n=6) foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 / 10 mg / kg, i.p.) e submetidos a um processo cirúrgico para expor artéria carótida que foi cateterizada com cateter de polietileno (P50) preenchida com solução salina. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (modelo MP100-CE; Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). Após um período de estabilização de 15 min, a pressão arterial sistólica e diastólica foram registrados. O cateter foi então introduzido no ventrículo esquerdo. Por um período adicional de estabilização de 15 min, variáveis como valores máximos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (+dP/dtmáx), que é a taxa máxima

de aumento da pressão ventricular, valores mínimos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (-dP/dtmin), que é a taxa de decaimento da pressão ventricular, constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (Tau) e a pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE) foram coletados. Após este procedimento, o cateter foi retirado do VE e a pressão arterial foi medida novamente para determinar se houve dano à válvula aórtica. O animal não foi incluído no estudo se observado redução da pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados usando o software LabChart7.

3.5. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Os animais foram anestesiados com fenobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.) e tiveram sua traquéia cateterizada (PE-240) para facilitar a respiração. A artéria carótida direita (PE 50), a veia jugular esquerda (PE 50) e bexiga (PE 320) dos animais foram cateterizadas para coleta de sangue, infusão de inulina e para-aminohipurato e coleta de urina, respectivamente. O volume urinário foi determinado gravimétricamente. Os animais foram infundidos durante o experimento com uma solução salina isotônica com manitol a 3% a uma velocidade de 0,06 mL/min mediante uma bomba de infusão contínua. Após a preparação do animal foi administrada por via intravenosa uma dose prime de inulina e paraaminohipurato (30mg/100g de peso corporal de inulina e 0,6mg/100g de peso corporal de PAH) e após este procedimento, teve início a infusão de manutenção destas substâncias. Após um período de estabilização de 30 minutos, foram realizados 4 períodos de coleta de urina de 30 minutos, seguidas por coletas de sangue. A determinação dos valores plasmáticos e urinários de inulina e paraaminohipurato foi realizada através do método modificado de Führ; Kaczmarczyk; Krüttgen (1955) e Freitas et al. (2015). Utilizando-se do fluxo urinário e quantificação dos valores plasmáticos e urinários de inulina e paraaminohipurato, foram calculadas as suas taxas de depuração, que refletem a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo plasmático dos animais (FPR), respectivamente segundo a seguinte fórmula:

$$\mathrm{Cl} = \frac{((X_u)\mathrm{x}(F_u))/X_p}{P}$$

Onde:

Cl = Clearance da substancia (inulina ou PAH) normalizado pelo peso corpóreo do animal;

X_u = Concentração da substancia na urina

X_p = Concentração da substancia no plasma

F_u = Fluxo urinário

P = Massa corporal do animal (kg)

Um capilar heparinizado foi preenchido de sangue para quantificação do hematócrito, o que permitiu o cálculo do fluxo sanguíneo renal (FSR) através da fórmula:

$$\mathrm{FSR} = \frac{FPR}{1 - Hemat}$$

Onde:
FPR = Fluxo plasmático renal
Hemat = Hematócrito
Durante o tempo supracitado, a pressão arterial média dos animais (PAM) foi continuamente registrada através da utilização de um transdutor de pressão conectado a um sistema de aquisição de dados. A resistência vascular renal (RVR) foi então determinada matematicamente através da lei de Ohm, conforme fórmula descrita a seguir:

$$\mathrm{RVR} = \frac{PAM}{FRS}$$

Onde:
PAM = Pressão arterial média
FSR = Fluxo sanguíneo renal

3.6. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após as avaliações hemodinâmicas, o sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os tubos foram centrifugados (3500 rpm, 10 minutos, 4ºC), o plasma foi separado, aliquotado em microtubos e congelados a -80ºC para as análises posteriores.

A seguir, os corações foram retirados, limpos em solução salina, pesados e tiveram o VE excisado para a determinação da hipertrofia, para tanto, o peso do VE foi normalizado pelo comprimento da tíbia (mg/cm). O Ventrículo Esquerdo (VE) foi então separado para a análise morfométricas. Para tanto, os ventrículos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por 24 horas, após o processamento histológico elas foram embebidas em parafina e cortes de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina/eosina (H&E) ou picrosirius red, para as análises de hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno, respectivamente. As lâminas foram fotografadas (400x) e pelo menos 10 imagens de cada animal foram analisadas utilizando o Software livre Image J® (versão 1.52i).

Paralelamente, os rins foram excisados, pesados e armazenados. Posteriormente os mesmos foram seccionados com 2 mm de espessura e fixados em paraformaldeído (PF) diluído em solução salina tamponada com fosfato (BPS) (4% PF-PBS) pH 7,4 por 24-48 h em temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram incluídos em parafina a 60^0 C e posteriormente seccionados em fatias de 5µm. As secções renais foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para visualizar a estrutura e regiões genais renais (TRUJILLO et al., 2016) e ácido periódico-Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MA) para visualizar a membrana basal (CASTIGLIONE et al., 2013). Além disso, a deposição superficial de colágeno no tufo glomerular cortical e área intersticial foi determinada usando Picrosirius Red (PSG e PST, respectivamente) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Para histomorfometria, 20-25 glomérulos e áreas corticais intersticiais por animal foram capturados com objetiva de 40x e analisados. Imagens de alta qualidade (2048 x 1536 pixels) foram obtidas com uma câmera Leica acoplada a um microscópio

(ICC50 HD Leica Microsystems). As imagens foram também mensuradas pelo software Image J (COUTINHO et al., 2016)

Para avaliação do número de glomérulos, foram selecionados 15-20 cortes renais em toda a extensão do rim, onde todos os glomérulos foram contados diretamente no microscópio óptico com lupa de 10x. O número de glomérulos foi então expresso como número por área (mm^2), conforme descrito por Bertram et al. (1992) e Buys-Gonçalves et al. (2020).

A deposição superficial de colágeno no tufo glomerular cortical e área intersticial foi determinada usando Picrosirius Red (PS) (LANDGRAF et al., 2014). A coloração de PS foi usada para quantificar a área total de deposição de fibra de colágeno em glomérulos (PSG) e a região túbulointersticial (PST) com 15 imagens cada. Os campos foram escolhidos aleatoriamente e os resultados representam a porcentagem do total de fibras de colágeno por área de tecido (CASTIGLIONE et al., 2013; COUTINHO et al., 2016). Os resultados representam a porcentagem do total de fibras de colágeno por área de tecido.

Para as análises histológicas do glomérulo, cortes corados com PAS foram usados para capturar 20 fotomicrografias de glomérulos, escolhidas aleatoriamente. As áreas do tufo glomerular e glomerular foram medidas em cada imagem usando o software Image J (CASTIGLIONE et al., 2013; COUTINHO et al., 2016). Os resultados representam a porcentagem da expansão total por área de tecido.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Parte do VE foram retirados e congelados (-80ºC) para a avaliação do estresse oxidativo e da expressão proteica. Essas amostras tiveram a quantidade de proteína determinada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Suscintamente, após a homogeneização das amostras, alíquotas de 10 uL foi adicionado ao reagente de Bradford (Biorad® São Paulo, SP, Brasil; 190uL), seguida de leitura em leitor de microplacas em 595nm (FilterMax F3/F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular

Devices, USA). Para a determinação da quantidade de proteínas, foi confeccionado uma curva padrão com albumina bovina (10-100ug/mL).

3.8. 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 pH7,4) e em seguida centrifugados (3500 rpm, 10 min). O sobrenadante (10 uL) 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 340 nm (FilterMax F3/F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, USA). O resultado foi 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%), seguida de ebulição por uma hora, após o resfriamento em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em placas de 96 poços e a absorbância foi lida em leitor de microplacas em 532nm (PATOČKOVÁ *et al.,* 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.

3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

Para a determinação da expressão proteica, alíquotas de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (Tris-HCL pH 7.4 -10 mM; PMSF - 1 mM; $NaVO_3$ -1 mM; SDS -1%; DTT -0.5 mM; EDTA -5 mM e inibidor de protease - Sigma Fast; Sigma, USA) e em seguida centrifugadas, o sobrenadante foi separado e armazenado a -80ºC até o momento das análises. Foi procedida a dosagem de proteínas conforme método descrito anteriormente e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel 7.5–10% SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% e depois expostas aos seguintes anticorpos primários: anti-SERCA2a ([1:1000], Affinity BioReagents, CO, USA); anti-PLB ([1:1000], Affinity BioReagents, CO, USA), anti-NCX ([1:1000], Affinity BioReagents, CO, USA), anti-p-Ser^{16}-PLB ([1:1000], Abcam, Inc., USA), anti-ACE1 ([1:200], NDL Sta Cruz, 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). Para a revelação, as membranas foram incubadas overnight com anticorpo primário, em seguida os anticorpos específicos foram incubados para a determinação das proteínas de interesse. Os sinais de Western blot foram quantificados usando o software Bio-Rad Image Lab 5.2.1, e os níveis de expressão de proteína foram normalizados para a expressão de GAPDH.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Para encontrar possíveis outliers nos resultados, um teste de Grubbs bilateral foi usado. Quando o teste identificou um outlier, usamos um método ROUT adaptado para detectar quaisquer outliers daquela coluna de resultados e os removemos de acordo com a configuração de Q em 1% (alfa = 0,01).

Os dados oriundos das análises dos parâmetros hemodinâmicos, tônus autonômico e demais análises relacionadas ao tecido cardíaco foram analisadas pelo teste T Student. Para as demais analises utilizou-se os testes omnibus D'Agostino e Pearson foram usados para avaliar a normalidade dos dados. Se o teste de normalidade revelou dados não gaussianos, então Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn foi usado. Se os dados passaram no teste de normalidade, então ANOVA unilateral seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas foi aplicada. Admitiu-se a significância quando $p < 0,05$ e as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 7.02, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. DADOS PONDERAIS

O tratamento com OXA não foi capaz de promover diferença em relação ao peso corporal final, assim como em relação a análise de hipertrofia ponderal (VE/comprimento tíbia e Rim E/comprimento tíbia), entretanto a pressão arterial média (PAM) apresentou-se maior nos grupos tratados de forma dose dependente, entretanto sem alterar a FC (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos do tratamento com OXA sobre dados biométricos, na relação peso VE (mg) e Rim E (mg)/ Comprimento tíbia (cm) e níveis de pressão arterial média, sistólica e frequência cardíaca.

Parâmetros	**CON**	**L-OXA**	**H-OXA**
Análises ponderais (n=6)			
Peso inicial (g)	84,50±5,011	85,00±2,878	77,80±5,329
Peso final (g)	286,5±23,64	308,8±12,95	290,0±13,98
Variação do peso (g)	202,0±23,58	233,8±11,38	226,2±13,38
Razão Peso VE/comprimento tíbia (mg/cm)	0,2025±0,01090	0,2062±0,00659	0,1891±0,00774
Razão Peso Testículo/comprimento tíbia (mg/cm)	0.375±0.0108	0.334±0.0179	0.350±0.0036
Peso rim (g)	1,246±0,054	1,124±0,040	1,015±0,052*
Razão Peso Rim E/comprimento tíbia (mg/cm)	0,3124±0.013	0,2998±0.009	0,2665±0.012*
Dados Hemodinâmicos (n=6)			
PAM (mm Hg)	98,85±6,118	108,9±1,272*	115,4±4,051*
FC (bpm.s^{-1})	398,1±15,82	400,7±19,24	371,1±3,592

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média * $p < 0.05$ vs. CONT; n = número de animais

4.2. TÔNUS AUTONÔMICO

O tratamento crônico com doses elevadas de OXA não promoveu prejuízo no componente parassimpático (Fig. 3A. CON: 143,0±7,746 bpm.s^{-1}; H-OXA: 140,3±12,67 bpm.s^{-1}) e simpático (Fig. 3B. CON: -35,63±10,31 bpm.s^{-1}; H-OXA: -28,50±6,745 bpm.s^{-1}) do controle autonômico da pressão bem como não houve alteração na FC intrínseca nos animais tratados quando comparados ao grupo controle (Fig. 3C. CON: 410,4±4,104 bpm.s^{-1}; H-OXA: 405,5±8,933 bpm.s^{-1}).

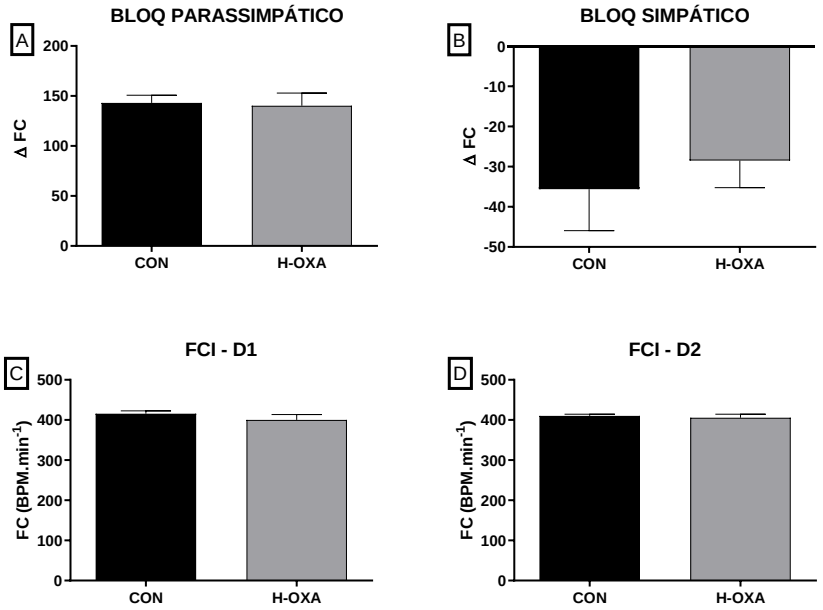


Figura 3: Resultado das análises de tônus autonômico. A: variação da frequência cardíaca frente ao bloqueio com a atropina. B: variação da frequência cardíaca frente ao bloqueio com atenolol. C: frequência cardíaca intrínseca (FCI – D1), na presença de duplo bloqueio no dia 1. D: frequência cardíaca intrínseca (FCI – D2), na presença de duplo bloqueio no dia 2.

4.3. DADOS HEMODINÂMICOS

Em animais anestesiados (n=6), a pressão arterial sistólica do ventrículo esquerdo (LVSBP) foi aumentada no grupo tratado com OXA (Fig. 4A e Tabela 2), entretanto, o tratamento não foi capaz de promover mudanças na +dP/dt max e -dP/dt min (Fig. 4B-C; Tabela 2). O mesmo foi constatado quando analisado a constante de tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (Tau) (Fig. 4D; Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do tratamento com OXA sobre parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo.

Parâmetros	**CON**	**H-OXA**
Parâmetros de contratilidade (n=6)		
dP/dt max + (mmHg/s)	5138±238,6	6306±475,5
dP/dt min – (mmHg/s)	-3785±109,9	-4105±315,0
Tau (s)	0,0191±0,002644	0,02099±0,001884
PSVE (mm Hg)	108,9±3,887	131,8±4,851*

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média □ $p < 0.05$ vs. CON; n = número de animais

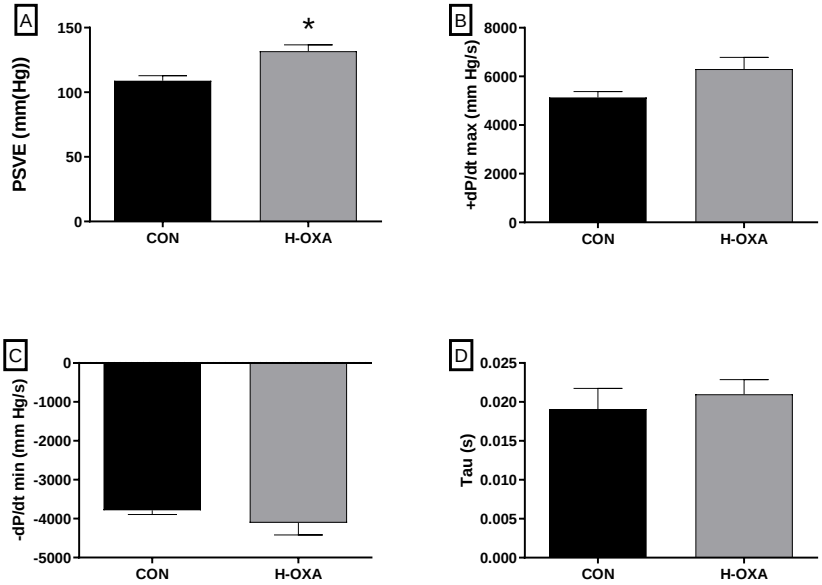


Figura 4: Parâmetros hemodinâmicos. (A): Pressão arterial sistólica ventricular esquerda (PSVE) (mm Hg), (B):derivadas positivas de dP / dt máximas no VE (mm Hg/s), (C): derivadas negativas de dP / dt mínimas no VE (mm Hg/s) e (D): constante de tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (Tau). Os dados são expressos como a média ± EPM. * p <0,05

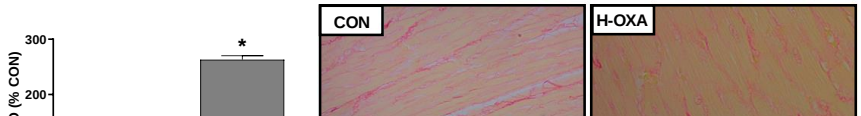
4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO VENTRICULO ESQUERDO

As análises morfométricas dos ventrículos demonstraram redução no número de cardiomiócitos por campo e aumento na área, perímetro, largura e comprimento dos núcleos dos cardiomiócitos (Tabela 3 e na Fig. 5 A-E), em conjunto esses resultados indicam hipertrofia cardíaca. Adicionalmente, a deposição de colágeno tecidual foi aumentada (Fig. 6 e tabela 3), demonstrando hipertrofia cardíaca.

Tabela 3: Dados histológicos dos VE dos animais tratados com OXA.

Parâmetros	**CON**	**H-OXA**
	Dados Histológicos (n=6)	
Área do núcleo (um^2)	3241±99,65	4737±195,2*
Perímetro nuclear (um)	271,9±3,598	324,1±7,645*
Comprimento do núcleo (um)	115,1±2,499	136,0±3,373*
Largura do núcleo (um)	35,71±0,7867	46,07±1,645*
Número de núcleo por campo	23,70±0,8157	15,89±0,4249*
% Colágeno (% CON)	100,0±5,312	263,2±6,968*

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média * $p < 0.05$ vs. CONT; n = número de animais



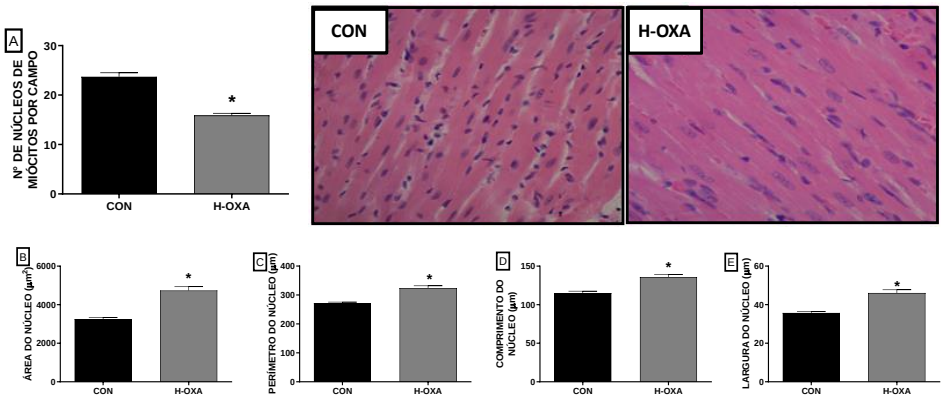


Figura 5: Efeitos da Oxandrolona em diferentes doses no remodelamento cardíaco ventricular esquerdo. É observado hipertrofia em ratos Wistar machos. (A): Número de miócitos por campo analisado seguido de imagens histológicas ilustrativas de cada grupo tratado, (B): área dos núcleos dos cardiomiócitos (μm^2), (C): perímetro do núcleo dos cardiomiócitos (µm), (D): comprimento do núcleo dos cardiomiócitos (µm) e (E): largura do núcleo dos cardiomiócitos (µm). As amostras foram visualizadas em microscopia ótica com aumento de 400x sendo as mesmas coradas com o método de hematoxilina / eosina (H & E) para observar hipertrofia. Os dados são expressos como média ± EPM. * p <0,05.

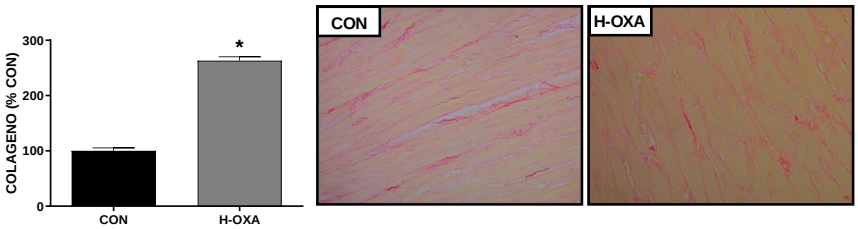


Figura 6: Análise histológica da deposição de colágeno cardíaco. Porcentagem de colágeno cardíaco seguido das imagens representativas de cada grupo estudado. As amostras foram coradas com picrosirius red para quantificar o conteúdo de colágeno, visualizado com microscopia óptica em aumento de 400x. Os dados são expressos como a média ± EPM. * p <0,05.

4.5. ANÁLISE DE WESTERN BLOT (SERCA2a, PLB, p-PLB, NCX e ECA)

A análise dos ventrículos esquerdos dos animais tratados com doses elevadas de OXA por Western blot revelou que a expressão da proteína SERCA2a aumentou no grupo H-OXA (Fig. 7A), não havendo diferença nas demais proteínas de contratilidade analisadas (Fig. 7B-C). Houve aumento no grupo na razão p-PLB/PLB (Fig. 7D), a razão SERCA2a/PLB (Fig. 7E). Adicionalmente, houve aumento na expressão da proteína ECA no grupo tratado quando comparado ao grupo CON (Fig. 8).

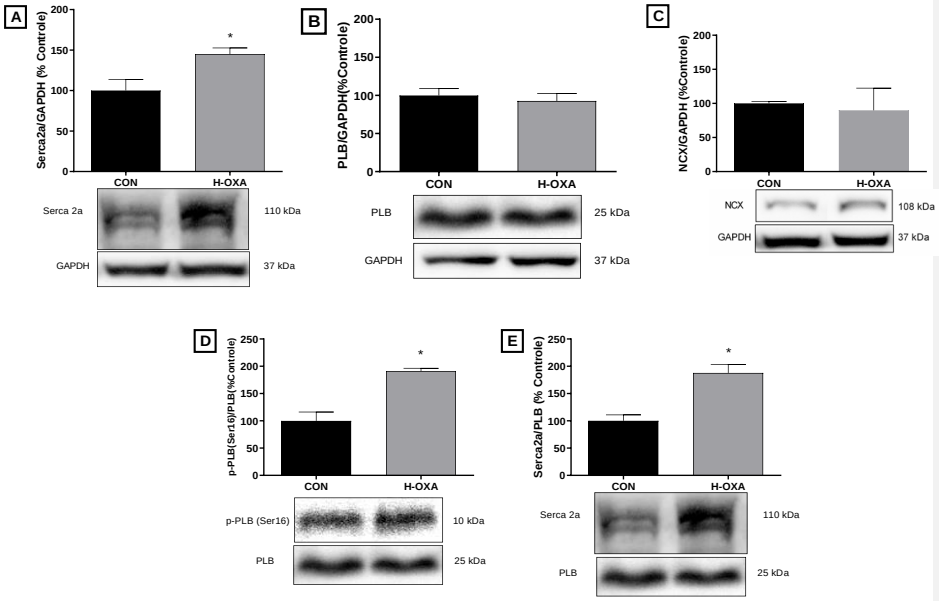


Figura 7: Análises representativas de Western blot com os valores densidométricos associados (normalizados para GAPDH). (A):SERCA 2a, (B): fosfolambam (PLB), (C): $Na^{+}Ca^{2+}$ trocador (NCX), (D): relação entre p-Ser16-PLB e PLB e (E) relação entre SERCA 2a e PLB nos corações de ratos tratados com OXA. Os valores são expressos como as médias ± EPM. * p<0,05.

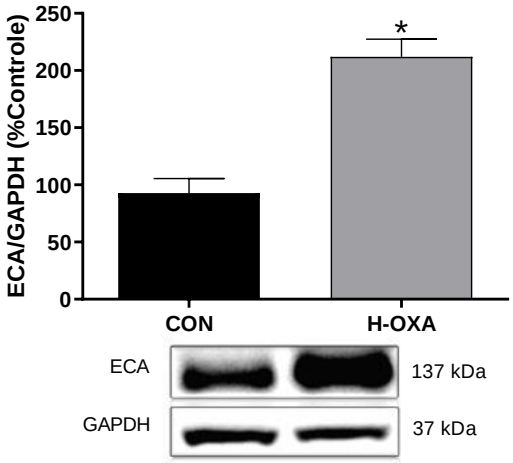


Figura 8: Análise representativa de Western blot com os valores densitométricos associados (normalizados para GAPDH) referentes a expressão da ECA nos corações de ratos tratados com OXA. Os valores são expressos como as médias ± EPM. * p<0,05.

4.6. ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO

A administração de OXA foi capaz de aumentar a formação de AOPP e TBARS no tecido cardíaco (Fig. 9A-B). A análise da expressão das proteínas antioxidantes superóxido dismutase 1 (SOD-Cu/Zn) e catalase (CAT) demonstrou aumento na expressão da SOD em (Fig. 9C) sem interferência na redução da expressão proteica da CAT (Fig. 9D).

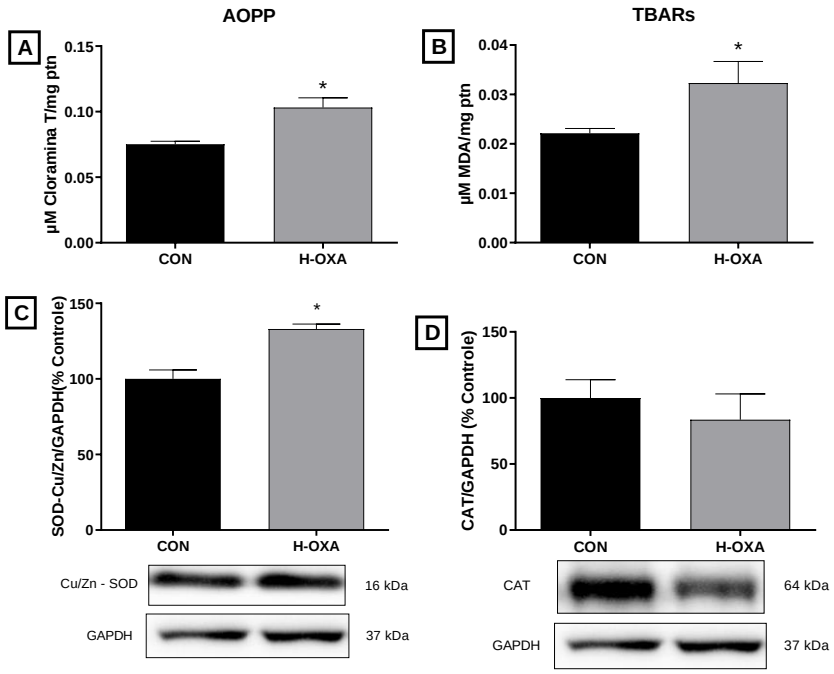


Figura 9: Análise de componentes do estresse oxidativo. (A): produtos de oxidação proteica avançada em tecido cardíaco (AOPP); (B): espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido cardíaco (TBARS); Expressão das proteínas SOD-Cu/Zn (C) e CAT (D) em tecido cardíaco com valores densitométricos associados (normalizados para GAPDH) em coração de animais tratados com diferentes doses de OXA. Os dados são expressos como a média ± EPM. * p <0,05

4.7. FUNÇÃO RENAL

O tratamento com OXA reduziu o clearance de inulina (CON: 6,282±0,5119 mL/min/Kg; L-OXA: 4,744±0,2719 mL/min/Kg H-OXA: 4,821±0,3946 mL/min/Kg), que representa a TFG (Fig.10A). Sem alterar os demais parâmetros como clearance de paraaminoipurato (CON: 14,75±1,005 mL/min/Kg; L-OXA: 16,40± 0,6668 mL/min/Kg; H-OXA: 13,77±1,462 mL/min/Kg), FSR (CON: 23,67±2,011 mL/min/Kg; L-OXA: 26,74±1,474 mL/min/Kg; H-OXA: 22,93±2,597 mL/min/Kg) e RVR (CON: 4,887±0,4328 a.u.; L-OXA: 4,104±0,3079 a.u.; H-OXA: 4,976±0,4404 a.u.) (Fig 10 B-D).

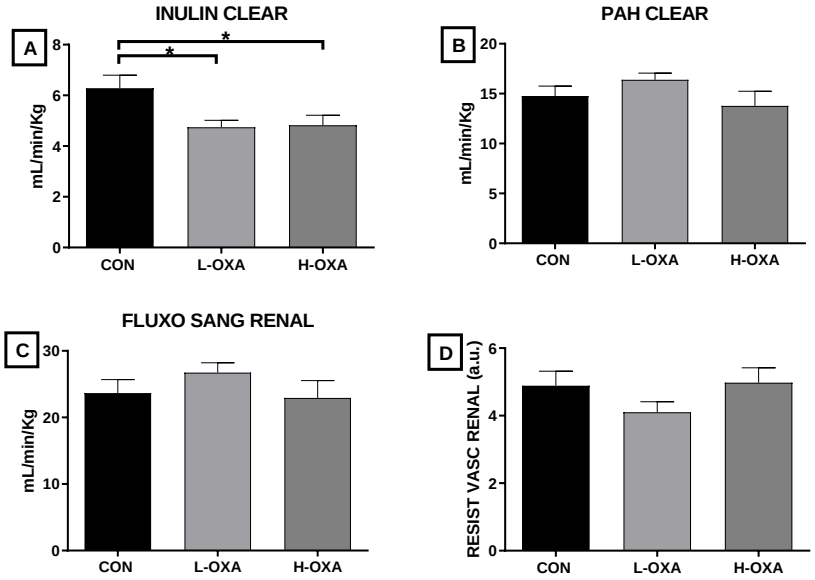


Figura 10: Análises representativas da influência do tratamento com OXA sobre a função renal. (A): Clearance de inulina que representa a TFG. (B): Clearance de paraaminoipurato, que representa a FPR, (C): Fluxo sanguíneo renal (FRS) e (D): Resistencia vascular renal (RVR). Os valores são expressos como as médias ± EPM. * p<0,05. n=7

4.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA RENAL

Os rins dos grupos L-OXA e H-OXA apresentaram anormalidades histológicas em comparação com o aspecto normal dos rins CON (CON Fig. 10A). Em especial, os rins L-OXA e H-OXA apresentavam atrofia de glomérulos, degeneração vacuolar tubular, proliferação celular pela presença de células em processo mitótico, apoptose em função da presença de células com núcleo picnótico e presença de células inflamatórias circundando os túbulos renais (L-OXA e H-OXA Fig.11 E, I).

Ratos CON exibiram glomérulos renais, cápsulas de Bowman e aspecto de espaços de Bowman normais (Fig. 11A, B). No entanto, os rins de ratos L-OXA (Fig. 11F) e H-OXA (Fig. 11J) exibiram anormalidades do espaço de Bowman, levando à redução na área do tufo glomerular em comparação com ratos controle (Fig. 11N) (CON 8,11 ± 0,32; L-OXA 6,82 ± 0,13; H-OXA 7,10 ± 0,11). Além disso, o aumento da deposição de colágeno glomerular (PSG, Fig. 11O) foi observado em rins L-OXA (Fig. 11G) e H-OXA (Fig, 11K) em comparação com rins dos controles (CON 3,93 ± 0,48 ; L-OXA 5,75 ± 0,31; H-OXA 8,74 ± 0,49), sugerindo um efeito dependente da dose. Da mesma forma, alta deposição de colágeno tubulointersticial (PST, Fig. 11 O) foi observada em rins L-OXA (Fig. 11H) e H-OXA (Fig. 11L) em comparação com rins do grupo controle, sugerindo novamente o efeito dose dependente (CON 3,83 ± 0,66; L-OXA 7,67 ± 0,47; H-OXA 11,70 ± 0,18).

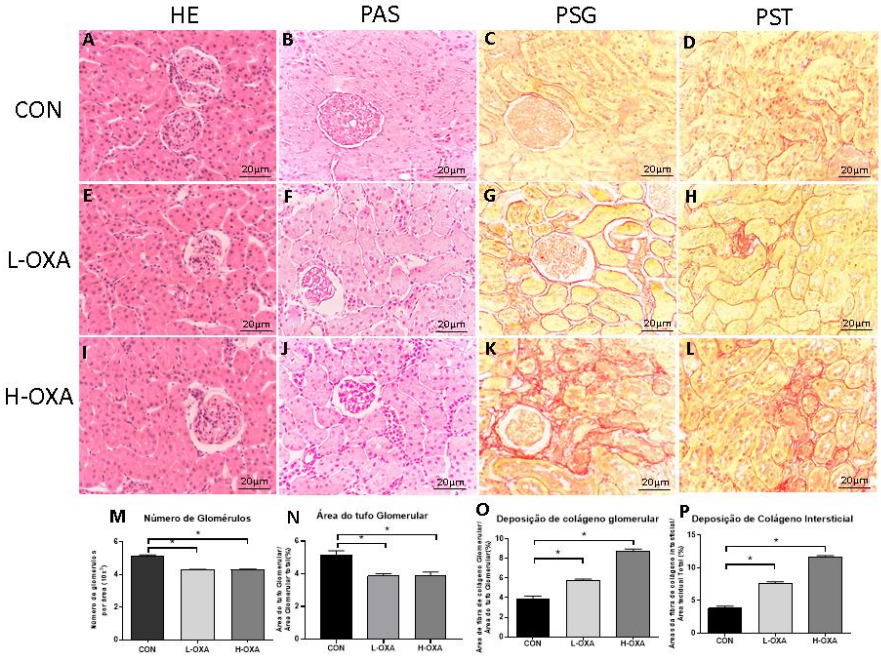


Figura 11: Avaliação histomorfológica em ratos machos CON, L-OXA D e HD-OXA. Seções H&E representativas dos rins (A) CON, (E) L-OXA e (I) H-OXA. Seções representativas de rim coradas com ácido periódico-Schiff (PAS) enfatizando os glomérulos de ratos (B) CON, (F) L-OXA e (J) H-OXA. (M) Representação gráfica da redução do número de glomérulos do L-OXA e H-OXA. (N) Representação gráfica da redução da área do tufo glomerular de ratos L-OXA e H-OXA. Glomérulos representativos corados com Picrosirius Red (PSG) de ratos (C) CON, (G) L-OXA e (K) H-OXA. (O) Representação gráfica do aumento da densidade superficial do colágeno nos glomérulos L-OXA e H-OXA. Área tubulointersticial representativa corada com Picrosirius Red (PST) de ratos (D) CON, (H) L-OXA e (L) H-OXA. (P) Representação gráfica do aumento da densidade superficial do colágeno na área tubulointersticial LD e HD. Os valores são expressos como a média ± SEM (n = 5). * p ≥ 0,05, * # p ≥ 0,01 vs CON (ANOVA de um fator seguido por Dunn's.

4.9. ESTRESSE OXIDATIVO RENAL

A administração de OXA foi capaz de aumentar a formação de TBARS e AOPP no tecido renal, sendo que este último só foi aumentado no grupo H-OXA (Fig. 12)

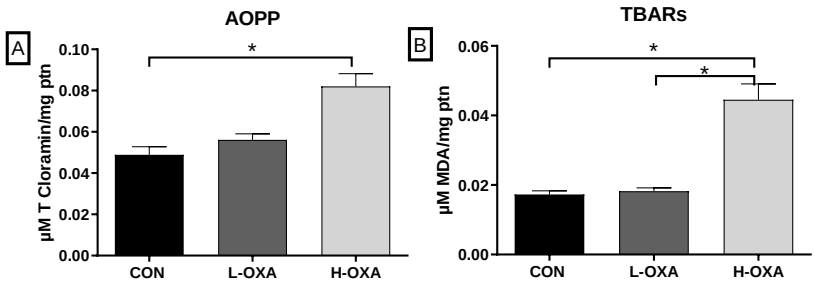


Figura 12: Análise de componentes do estresse oxidativo em tecido renal. (A): produtos de oxidação proteica avançada em tecido renal (AOPP); (B): espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecido renal (TBARS);

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou alterações subclínicas no coração após tratamento crônico com OXA em alta dose, enquanto que no rim já observamos alteração funcional. Os resultados mostraram a presença de remodelamento cardíaco sem modificações nos parâmetros fisiológicos (tônus autonômico cardíaco e contratilidade cardíaca), mas com alterações na expressão de proteínas envolvidas na mobilidade do cálcio. Essas modificações podem estar relacionadas ao aumento da expressão da ECA, possível causa da deposição de colágeno no tecido cardíaco. No rim, os grupos tratados apresentaram redução do clearance de inulina, demonstrando redução da taxa de filtração glomerular, podendo ser associado ao depósito de colágeno na ultraestrutura glomerular e também ao aumento do estresse oxidativo.

Nesse manuscrito apresentamos os dados obtidos do uso de dose de 37,5 mg/kg/dia de oxandrolona para mimetizar uma dose abusiva em seres humanos, como descrevemos no material e métodos. Entretanto, em manuscrito prévio (RONCHI et al., 2021) onde parte dos dados aqui mostrados foram publicados (dados cardíacos), também foram publicados os resultados do uso de OXA em baixa dose (2,5 mg/kg/dia). No referido manuscrito, fizemos a comparação entre as duas doses, e quando for oportuno, iremos fazer essas comparações na discussão, considerando se as alterações foram ou não dose dependente.

A hipertrofia cardíaca foi demonstrada por diferentes índices mostrados pelos dados histológicos. Essa alteração estava associada ao aumento significativo nos níveis de colágeno no grupo tratado com a dose elevada de OXA, que levou a aumento de 163% quando comparado aos níveis de colágeno dos animais controle. Em relação ao aumento do colágeno, essa alteração foi dose dependente, ou seja, com aumento da dose foi observado aumento de colágeno (RONCHI et al., 2021). A hipertrofia cardíaca pode ser fisiológica ou patológica, esta última está associada ao aumento na deposição de colágeno (DAS NEVES et al., 2013; TANNO et al., 2011). Como exemplo de hipertrofia fisiológica, podemos citar o exercício físico, que em geral leva a hipertrofia fisiológica. Com o exercício físico, a estrutura miocárdica é remodelada em função do tipo de treinamento físico, por meio de um aumento equilibrado da massa miocárdica, que engloba hipertrofia miocitária e neoangiogênese (SHEPHARD; BALADY, 1999). A hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício tem

como característica o crescimento fisiológico do coração e está associada à estrutura cardíaca normal com função mantida ou melhorada, sem aumento na deposição de colágeno (MIHL; DASSEN; KUIPERS, 2008).

Os EAA podem induzir hipertrofia cardíaca por meio de alguns mecanismos, como se seguem. Os EAA, como análogos da testosterona, podem estimular os receptores de andrógenos, que são amplamente expressos nos cardiomiócitos e responsáveis por mediar a resposta hipertrófica do coração à ação dos andrógenos(MARSH et al., 2012). Além disso, outro possível mecanismo de hipertrofia promovido pela OXA que poderia induzir a deposição patológica de colágeno está relacionado ao SRAA. BRILLA e colaboradores (1994) em seu estudo, demonstraram o papel da ANG II sobre a síntese de colágeno por meio dos receptores AT1 e AT2 presentes nos fibroblastos cardíacos de ratos. Além disso, estudos anteriores mostraram que os inibidores da ECA podem prevenir a hipertrofia cardíaca e a deposição de colágeno em ratos tratados com EAA (ANDRADE, et al., 2012; MELO JUNIOR et al., 2018), o que corrobora a hipótese de uma associação positiva entre o EAA e a ativação do SRAA, como mecanismo de remodelamento cardíaco. No nosso estudo, observamos aumento significativo da expressão proteica da ECA nos corações de ratos tratados com doses elevadas de OXA, sendo na ordem de 112% em relação aos valores do grupo controle e de forma interessante, essa alteração também foi dependente da dose uma vez que a dose baixa de OXA elevou a expressão dessa mesma proteína para 52% (RONCHI et al., 2021).

No presente estudo, a hipertrofia observada nos corações dos animais do grupo OXA, pode estar relacionada ao aumento da expressão da ECA, porque a contratilidade cardíaca não foi alterada pelo método aqui utilizado, apesar das mudanças na expressão das proteínas de mobilidade do cálcio. Nesse sentido, a função fisiológica dessas proteínas pode ser exemplificada pelo papel da PLB. A inativação dessa proteína por fosforilação resulta em aumento da atividade de SERCA2a e, como consequência, na amplificação da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, que por sua vez facilita o relaxamento e a contratilidade (PAREKH; PUTNEY, 2005). Nenhuma diferença nos parâmetros de contratilidade foi observada no grupo H-OXA, apesar do aumento na relação da expressão de p-PLB / PLB e na razão SERCA2a / PLB, que poderiam aumentar a contratilidade. Além disso, a expressão do trocador Na / Ca permaneceu inalterada no grupo tratado com OXA, podendo desta forma,

estar contribuindo para a preservação da contratilidade normal. Vale ressaltar que a dose baixa de OXA também não alterou a contratilidade cardíaca (RONCHI et al., 2021). Nossas hipóteses sobre o papel das proteínas usadas na mobilidade do cálcio são baseadas na revisão de KHO, LEE e HAJJAR (2012).

A ausência de alterações nos parâmetros de contratilidade pode ser decorrente do tempo de tratamento empregado e do tipo de EAA utilizado nesta investigação. Estudos anteriores demonstraram que altas doses de DN levam ao aumento da contratilidade cardíaca em ratas Wistar (NASCIMENTO, et al., 2016) e em ratos SHR machos (MELO JUNIOR et al., 2018). Essas alterações na contratilidade cardíaca provavelmente foram causadas pelo aumento nas expressões de SERCA2a e p-PLB, favorecendo um aumento nos parâmetros de contratilidade. Por outro lado, (ROCHA e colaboradores (2007) aplicaram altas doses de EAA, mas não observaram variações no processo de contratilidade. Porém, o presente estudo evidenciou aumento da PSVE e aumento da PDFVE no grupo H-OXA, o que pode indicar aumento da rigidez ou redução da complacência da parede ventricular, podendo resultar em insuficiência cardíaca em longo prazo (BORLAUG; PAULUS, 2011; MADY et al., 1999), associada ao acúmulo de colágeno e hipertrofia cardíaca que encontramos nestes animais. Embora não tenham sido observadas alterações na contratilidade na presente investigação, deve-se enfatizar que o remodelamento cardíaco desempenha um papel importante na fisiopatologia da disfunção ventricular e em sua estrutura; nesse sentido, alterações bioquímicas e / ou genéticas podem resultar em danos progressivos à função cardíaca. Por esse motivo, estudos sobre o uso de EAA em longo prazo e em altas doses são importantes.

Também avaliamos o tônus autonômico, e a administração de OXA não promoveu disfunção autonômica. Um estudo anterior avaliando o estanozolol em ratos Wistar machos encontrou aumento da pressão arterial e alterações na sensibilidade do barorreflexo, sem alterações no tônus simpático cardíaco (BEUTEL; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2005). No entanto, ratos Wistar machos tratados com DN 10mg / kg por 4 semanas apresentaram valor basal de FC menor que o grupo controle, sugerindo alterações no tônus autonômico cardíaco (ANDRADE, et al., 2008). Outros estudos demonstraram que doses supraterapêuticas de EAA em ratos machos aumentaram a estimulação simpática e promoveram disautonomia cardíaca (NASCIMENTO; MEDEI, 2011; TURILLAZZI et al., 2011). Nascimento e Medei (2011 observaram disautonomia

cardíaca, com aumento da modulação simpática e diminuição da modulação parassimpática. No entanto, esses resultados são controversos na literatura, pois existem diferenças nos protocolos aplicados, diferentes EAA, bem como na duração do tratamento, espécie e idade dos animais.

Outros mecanismos podem estar envolvidos no aumento nas pressões observada nos grupos OXA, que foram dose dependente (RONCHI et al., 2021), como alteração na pós-carga, devido ao aumento da resistência vascular periférica que poderia ser induzida pelo OXA. Um estudo utilizando altas doses de EAA por 8 semanas observou comprometimento da reatividade vascular em ratas Wistar, que era dependente da redução da produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase (CALIMAN et al., 2017). Outros estudos demonstraram, em humanos, um comprometimento da vasodilatação que pode ser dependente do endotélio (EBENBICHLER et al., 2001) ou independente do endotélio, e também devido ao aumento da rigidez vascular (LANE et al., 2006). O uso de EAA na fase pré-púbere pode induzir alterações autonômicas e hidroeletrolíticas que se manifestam na idade adulta, podendo ser fatores determinantes na elevação da pressão arterial em animais experimentais sob a ação de EAA (OLIVARES et al., 2014).

A fisiopatologia das doenças cardíacas está ligada ao estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS), como O2- e H2O2, podem ser formadas pelo citocromo P450, xantina oxidase, transporte mitocondrial de elétrons e família de enzimas NADPH oxidase (Nox) (AGUIRRE; LAMBETH, 2010). Em contrapartida, enzimas antioxidantes, como SOD e catalase, desempenham papel fundamental na homeostase de ROS (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). Nesse contexto, este estudo avaliou o balanço redox no tecido cardíaco medindo tanto a expressão das enzimas antioxidantes SOD1 e CAT, quanto a oxidação de proteínas e peroxidação lipídica.

OXA promoveu aumento na expressão de SOD1 no grupo H-OXA, que também foi observado em dose baixa, mas não de forma dose dependente(RONCHI et al., 2021). Está enzima catalisa a dismutação do radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Um aumento em sua expressão pode levar a maior produção de H_2O_2, que posteriormente é convertido em água e oxigênio pela catalase. Nossos resultados, demonstraram valores aumentados de AOPP no coração do grupo OXA, indicando alteração do equilíbrio redox. O desequilíbrio redox, também foi observado no rim destes animais, que aumentou tanto os índices avaliados pela AOPP, quanto

pelo TBARS, demonstrando que o rim pode ser mais sensível aos efeitos da OXA. É bem conhecido que altas concentrações de ROS podem inativar enzimas, promover a oxidação de proteínas e / ou mesmo promover a peroxidação lipídica nas membranas (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). A enzima que atua sobre o ânion superóxido, a SOD1, foi superexpressa, possivelmente para neutralizar a indução de estresse oxidativo causada pelo tratamento com OXA no coração.

Até onde sabemos, não existem estudos avaliando os efeitos da OXA sobre o estresse oxidativo. No entanto, alguns estudos usando outro EAA (decanoato de nandrolona) mostraram que a administração crônica de EAA pode perturbar o equilíbrio redox, levando a um estado de estresse oxidativo aumentado. FRANKENFELD e colaboradores (2014) usando 1 mg / 100g de DN administrado semanalmente por 8 semanas, encontraram diminuição da atividade da catalase nos rins e fígado sem promover alterações cardíacas. Por outro lado, a atividade da SOD foi reduzida apenas no fígado, embora aumentos na expressão da NADPH oxidase e na produção de H_2O_2 tenham sido observados apenas no coração.

Considerando esses resultados, e apesar de a produção de H_2O_2 e a expressão de NADPH oxidase não terem sido medidas diretamente no coração, nossa hipótese corrobora os resultados de estudo anterior (FRANKENFELD et al., 2014) que mostram um aumento desses parâmetros em corações de ratos machos tratados com DN. Assim, em nosso estudo, o aumento na produção de EROS pode ultrapassar a proteção do antioxidante e promover a oxidação de proteínas no grupo H-OXA.

Em relação aos protocolos que avaliaram o efeito da OXA na função renal, parecem demonstrar que os rins dos animais OXA, de forma geral, foram mais afetados do que o coração. No rim, observamos alterações estruturais (menor peso dos rins, aumento de colágeno, redução do tufo glomerular e de glomérulos), assim como aumento de apoptose, inflamação e do estresse oxidativo, que podem estar associadas a alteração funcional (menor taxa de filtração glomerular).

Os efeitos deletérios atribuídos ao uso dos EAA foram demonstrados em diversos órgãos importantes para a manutenção da homeostase (CARMO et al., 2011), como o rim (RIEZZO et al., 2014). O rim tem como função principal a depuração sanguínea e a manutenção do volume corporal, para tanto é necessário que os néfrons, unidade funcional do rim, estejam funcionando corretamente.

Como citado anteriormente, Frankenfeld et al. (2014) estudaram a influência do tratamento com DN no estresse oxidativo em tecidos alvo, como fígado, rim e coração. Foi observado aumento desse estresse no rim, caracterizado por redução na atividade da enzima catalase e outros efeitos deletérios sobre o rim foram relatados. POZZI e colaboradores (2013) observaram dano genético no rim dos animais tratados com altas doses de DN (15mg/kg) por meio do teste cometa. Em relação ao peso renal, demonstramos redução do peso do rim esquerdo e direito nos grupos H-OXA, o que está em acordo com os dados da histologia, pela qual observamos redução do tufo glomerular e de glomérulos. Diferentemente, HOSEINI et al. (2009) demonstraram aumento no peso e no volume do rim e do córtex renal nos animais tratados com DN, esses e outros autores atribuem esse resultado a presença de receptores androgênicos no tecido renal, que viabilizam a hipertrofia e hiperplasia dessas células (GELMANN, 2002).

A literatura indica que os andrógenos podem promover efeitos negativos no rim (BÁBÍČKOVÁ et al., 2015; GAVA et al., 2011). Testosterona aplicada no pré-natal de ratos, e observou que este hormônio é capaz de aumentar a proteinúria nos animais tratados (2mg/kg) tanto em machos quanto fêmeas, e que o uso do antagonista flutamida, aboliu esses efeitos. Nas fêmeas tratadas com flutamida, houve ainda aumento do clearance de creatinina, e em machos esse tratamento reduziu deposição de colágeno intersticial.

Nem sempre a deposição de colágeno altera a função renal, em estudo realizado em ratas e tratadas com DN, as mudanças na ultraestrutura renal (deposição de colágeno), não foram suficientes para promover mudanças no padrão de excreção renal de creatinina e sódio. Esse mesmo estudo, mostrou aumento da expressão gênica do peptídeo natriurético atrial (ANP) no rim, que pode ter sido responsável para a não alteração dos parâmetros renais avaliados (BRASIL et al., 2014).

Avançando nas alterações estruturais, Riezzo et al. (2014) evidenciaram que a dose empregada de DN influencia diretamente nas lesões renais observadas. Animais tratados com 10mg/kg/semana apresentaram colapso da ultraestrutura glomerular, além de aumento nas citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa e a Interleucina 1-beta). O tratamento promoveu aumento da proteína de choque térmico 90, que associado ao resultado positivo no teste de túnel indica apoptose tecidual. Esses dados relatam que o tecido renal é um importante alvo para

a ação dos androgênicos, e os danos nesse órgão podem influenciar negativamente a homeostase do organismo. O processo inflamatório que pode ter ocorrido nos rins dos ratos tratados com OXA (aumento de células inflamatórias), aumento do estresse oxidativo, redução do tufo glomerular, apoptose e maior deposição de colágeno, fatores esses que poderiam explicar a redução da taxa de filtração glomerular, conforme observado no nosso estudo, por alteração estrutural do glomérulo.

Um paciente adulto é identificado com doença renal crônica (DRC) quando apresenta, por um período igual ou superior a três meses com TFG menor que 60 ml/min/ 1,73 m2, ou TFG maior que 60 ml/min/ 1,73 m2, mas com evidência de lesão da estrutura renal (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002). Não podemos comparar nossos resultados em ratos com os parâmetros utilizados em seres humanos, mas já podemos observar a redução da TFG em ambas as doses de OXA, assim como temos indicativo de houve lesão da estrutura renal. Mas essa alteração funcional, pode estar relacionada ao que ocorre no coração, pois é sabido que a DRC representa maior risco de complicações e mortalidade, principalmente as cardiovasculares.

Podemos especular, assim como ocorreu no coração, que no rim também possa ter ocorrido aumento da expressão da ECA, e a ECA aumentada levaria a maior produção da ANGII. E bem claro na literatura a relação desse peptídeo e aumento das ERO's. Na arteríola eferente e tecido renal, a ANG II aumenta as ERO's (CARLSTRÖM et al., 2010; WANG et al., 2004), contribuindo para aumento da RVR em camundongos e coelhos machos (LAI et al., 2012; WANG et al., 2004).

Adicionalmente, o estresse oxidativo contribui para surgimento e manutenção de doenças renais e o tratamento com antioxidantes é capaz de reduzir a injúria renal e melhorar a FR em ratos SHR machos (RODRIGUEZ-ITURBE et al., 2003; SCHNACKENBERG; WELCH; WILCOX, 1998). Dentre os marcadores usados estão malondialdeído (indicado pelas análises de TBAR's) e os produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) os quais acumulam-se com a progressão da disfunção renal (SMALL et al., 2012), e no soro de pacientes com DRC (MEZZANO et al., 2001), assim como encontramos esses marcadores aumentados no nosso estudo, nos rins dos animais OXA. O acúmulo crônico de AOPPs no plasma tem sido associado à perda de podócitos, proteinúria e glomeruloesclerose. Além disso, assim como são considerados como marcadores de estresse oxidativo, o papel pró-inflamatório desses compostos também tem sido sugerido (CHEN, 2015; SELMECI, 2011).

Adicionalmente, a apoptose induzida por AOPP's pode ser bloqueada pelo pré-tratamento de podócitos com inibidores da NADPH oxidase e sequestradores de radicais livres in vitro(ZHOU, et al., 2009), podendo indicar que a apoptose relacionada ao AOPP está relacionada a ativação da NADPH oxidase (ZHOU et al., 2019)

Nos rins dos animais L-OXA, não encontramos aumentado os AOPP, mas observamos aumento do malondialdeído nos dois grupos tratados. Esse último marcador, também está relacionado a prejuízo da função renal. Assim, em uma coorte de 176 pacientes com DRC estágio 1 a 5, os níveis séricos de interleucina-6 e malondialdeído foram significativamente aumentados e inversamente relacionados à TFG, enquanto os níveis séricos de superóxido dismutase e glutationa peroxidase foram significativamente diminuídos. Deve-se notar que esses marcadores foram positivamente correlacionados com malondialdeído e negativamente associados com superóxido dismutase e glutationa peroxidase, e esses fatores endossam ainda mais a relação entre inflamação e estresse oxidativo na DRC (XU et al., 2013).

Esses dados da literatura reforçam que os animais do grupo OXA possuem prejuízo da função renal e que não pode ser descartado a hipótese de que com maior tempo e/ou maior dose os animais poderiam evoluir para maior prejuízo dessa função.

O estresse oxidativo e a inflamação, bem como sua interação, são considerados os principais pilares na patogênese e progressão da DRC (OBERG et al., 2004; TUCKER; SCANLAN; DALBO, 2015; XU et al., 2013). O estresse oxidativo promove a inflamação via formação de lipídios oxidados pró-inflamatórios, AOPPs e produtos finais de glicação avançada (DUNI et al., 2019; ESTEBAN et al., 2004). Desta forma, acreditamos que muitos dos efeitos não benéficos da OXA encontrados no presente estudo, são determinados pelo desequilíbrio redox que esse EAA determina, de forma sistêmica, uma vez que o coração também foi afetado.

Finalmente, a avaliação dos dados ponderais revelou que o peso corporal e testicular permaneceram inalterados nos animais tratados com OXA, quando comparados ao grupo CON. Esse resultado corrobora dados de estudo anterior (GROKETT; AHMAD, 1992) no qual não foi observada variação no peso corporal final de ratos tratados com OXA por 27 dias, duração de tratamento semelhante à nossa. Embora neste mesmo estudo haja redução do peso testicular, a espécie, a dose e a via de administração foram diferentes, além de os dados serem apresentados apenas como peso do órgão,

enquanto em nosso estudo foi avaliada a relação peso testicular / comprimento da tíbia.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados demonstram que OXA promove alterações subclínicas deletérias, como remodelamento cardíaco patológico associado ao aumento da expressão da ECA e alteração nas proteínas mobilizadoras de cálcio que podem afetar a função cardíaca em longo prazo, embora, nas condições experimentais utilizadas no nosso estudo, não foi observada alteração nessa função.

Em uma abordagem translacional, podemos inferir que o uso de OXA em humanos, principalmente em pacientes que apresentam alguma alteração da função cardíaca, deve ser feito com cautela. No entanto, mais estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para avaliar seu uso em doses abusivas.

7. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 49, no. 9, p. 1342–1353, 2010. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027.

AHMED, A.; CAMPBELL, R. C. Epidemiology of Chronic Kidney Disease in Heart Failure. **Heart Failure Clinics**, vol. 4, no. 4, p. 387–399, 2008. https://doi.org/10.1016/j.hfc.2008.03.008.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AKYUREK, M.; DUNN, R. M. Oxandrolone. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol. 118, no. 3, p. 791–794, 2006. DOI 10.1097/01.prs.0000233034.29726.c9. Available at: http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006534-200609010-00033.

ANDRADE, Tadeu Uggere de; LOIOLA, L. Z.; ALCURE, S. M. N.; MEDEIROS, A. R. S.; SANTOS, M. C. L. F. S.; MOYSÉS, M. R.; ABREU, G. R. de; LENZ, D.; BISSOLI, N. S. Role of the renin–angiotensin system on the nandrolone-decanoate-induced attenuation of Bezold-Jarisch reflex. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 90, no. 2, p. 271–271, 2012. https://doi.org/10.1139/y11-129.

ANDRADE, Tadeu U; SANTOS, C. S.; BUSATO, V. C. W.; MEDEIROS, A. R. S.; ABREU, G. R.; MOYSE, M. R.; BISSOLI, N. S. Higher Physiological Doses of Nandrolone Decanoate Do Not Influence the Bezold-Jarish Reflex Control of Bradycardia. **Archives of Medical Research**, vol. 39, p. 27–32, 2008. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.06.020.

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

BÁBÍČKOVÁ, J.; BORBÉLYOVÁ, V.; TÓTHOVÁ, L.; KUBIŠOVÁ, K.; JANEGA, P.; HODOSY, J.; CELEC, P. The renal effects of prenatal testosterone in rats. **Journal of**

Urology, vol. 193, no. 5, p. 1700–1708, 2015. https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.12.093.

BAGSHAW, S. M.; CRUZ, D. N.; ASPROMONTE, N.; DALIENTO, L.; RONCO, F.; SHEINFELD, G.; ANKER, S. D.; ANAND, I.; BELLOMO, R.; BERL, T.; BOBEK, I.; DAVENPORT, A.; HAAPIO, M.; HILLEGE, H.; HOUSE, A.; KATZ, N.; MAISEL, A.; MANKAD, S.; MCCULLOUGH, P.; … RONCO, C. Epidemiology of cardio-renal syndromes: Workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 25, no. 5, p. 1406–1416, 2010. https://doi.org/10.1093/ndt/gfq066.

BARON, D. A.; MARTIN, D. M.; ABOL MAGD, S. Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review. **World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, vol. 6, no. 2, 2007. .

BENNETT, N. C.; GARDINER, R. A.; HOOPER, J. D.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 42, no. 6, p. 813–827, 2010. DOI 10.1016/j.biocel.2009.11.013. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.013.

BERTRAM, J. F.; SOOSAIPILLAI, M. C.; RICARDO, S. D.; RYAN, G. B. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. **Cell & Tissue Research**, vol. 270, no. 1, p. 37–45, 1992. https://doi.org/10.1007/BF00381877.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 93, no. 1, p. 43–48, 2005. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.11.003.

BISSOLI, N. S.; MEDEIROS, A. R. S.; SANTOS, M. C. S.; BUSATO, V. C. W.; JARSKE, R. D.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; DE ANDRADE, T. U. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacological Research**, vol. 59, no. 6, p. 379–384, 2009. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.001.

BORLAUG, B. A.; PAULUS, W. J. Heart failure with preserved ejection fraction: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. **European Heart Journal**, vol. 32, no. 6, p. 670–679, 2011. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq426.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, no. 1–2, p. 248–254, 1976. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL, G. A.; LIMA, E. M. de; NASCIMENTO, A. M. do; CALIMAN, I. F.; MEDEIROS, A. R. S. de; SILVA, M. S. B.; ABREU, G. R. de; REIS, A. M. dos; ANDRADE, T. U. de; BISSOLI, N. S. Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system. **Life Sciences**, vol. 137, p. 65–73, 2015. DOI 10.1016/j.lfs.2015.07.005. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.005.

BRASIL, G. A.; RONCHI, S. N.; DO NASCIMENTO, A. M. arques; DE LIMA, E. M. iranda; ROMÃO, W.; DA COSTA, H. B. arcellos; SCHERER, R.; VENTURA, J. A.; LENZ, D.; BISSOLI, N. S.; ENDRINGER, D. C.; DE ANDRADE, T. U. ggere. Antihypertensive effect of Carica papaya via a reduction in ACE activity and improved baroreflex. **Planta medica**, vol. 80, no. 17, p. 1580–1587, 2014. https://doi.org/10.1055/s-0034-1383122.

BREINER, M.; ROMALO, G.; SCHWEIKERT, H. U. Inhibition of androgen receptor binding by natural and synthetic steroids in cultured human genital skin fibroblasts. **Klinische Wochenschrift**, vol. 64, no. 16, p. 732–737, 1986. https://doi.org/10.1007/BF01734339.

BRILLA, C. G.; ZHOU, G.; MATSUBARA, L.; WEBER, K. T. Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat CardiacFibroblast: response to angiotensin II and aldosterone. **J Mol Cell Cardiol**, vol. 26, p. 809–820, 1994. .

BROWN- SÉQUARD, F. R. S. THE EFFECTS PRODUCED ON MAN BY SUB-CUTANEOUS INJECTIONS OF A LIQUID OBTAINED FROM THE TESTICLES OF ANIMALS. **THE LANCET**, , p. 105–107, 1869. .

BUTENANDT, A.; HANISCH, G. Uber die Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstenol-(17)-one-(3) (Testosterone); um Weg zur Darstellung des Testosterons

auf Cholesterin (Vorlauf Mitteilung). **Chemische Berichte**, vol. 68, no. 9, p. 1859–1862, 1935. .

BUYS-GONÇALVES, G. F.; SAMPAIO, F. J. B.; SILVA, M. E. M.; PEREIRA-SAMPAIO, M. A.; DE SOUZA, D. B. Histomorphometric evaluation of the rat kidney submitted to warm ischemia and the protective effect of resveratrol. **American Journal of Surgery**, vol. 220, no. 4, p. 1119–1123, 2020. DOI 10.1016/j.amjsurg.2020.02.025. Available at: https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2020.02.025.

CALIMAN, I. F.; BERNABE, C. S.; DE MELO, A. F.; BRASIL, G. A.; DO NASCIMENTO, A. M.; DE LIMA, E. M.; FIGUEIREDO, S. G.; DE ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S. Long-term treatment with Nandrolone Decanoate impairs mesenteric vascular relaxation in both sedentary and exercised female rats. **Steroids**, vol. 120, p. 7–18, 2017. DOI 10.1016/j.steroids.2017.02.001. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.02.001.

CARLSTRÖM, M.; LAI, E. Y.; MA, Z.; STEEGE, A.; PATZAK, A.; ERIKSSON, U. J.; LUNDBERG, J. O.; WILCOX, C. S.; PERSSON, A. E. G. Superoxide dismutase 1 limits renal microvascular remodeling and attenuates arteriole and blood pressure responses to angiotensin II via modulation of nitric oxide bioavailability. **Hypertension**, vol. 56, no. 5, p. 907–913, 2010. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.159301.

CARMO, E. C. do; ROSA, K. T.; KOIKE, D. C.; FERNANDES, T.; DA SILVA, N. D.; MATTOS, K. C.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C. C.; DE OLIVEIRA, E. M. Association between anabolic steroids and aerobic physical training leads to cardiac morphological alterations and loss of ventricular function in rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, vol. 17, no. 2, p. 137–141, 2011. https://doi.org/10.1590/S1517-86922011000200014.

CASTIGLIONE, R. C.; MARON-GUTIERREZ, T.; BARBOSA, C. M. L.; ORNELLAS, F. M.; BARREIRA, A. L.; DIBARROS, C. B. A.; VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A.; PAREDES, B. D.; PASCARELLI, B. M.; DIAZ, B. L.; ROSSI-BERGMANN, B.; TAKIYA, C. M.; ROCCO, P. R. M.; SOUZA-MENEZES, J.; MORALES, M. M. Bone marrow-derived mononuclear cells promote improvement in glomerular function in rats with early diabetic nephropathy. **Cellular Physiology and Biochemistry**, vol. 32, no. 3, p. 699–718, 2013. https://doi.org/10.1159/000354473.

CHANNON, K. M.; GUZIK, T. J. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: Relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. **Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 53, no. 4 I, p. 515–524, 2002. .

CHEN, J.-T. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Postmenopausal Osteoporosis. **Medical Science Monitor**, vol. 21, p. 2428–2432, 2015. DOI 10.12659/MSM.894347. Available at: http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/894347.

CHENG, T. H.; CHENG, P. Y.; SHIH, N. L.; CHEN, I. B.; WANG, D. L.; CHEN, J. J. Involvement of Reactive Oxygen Species in Angiotensin II-Induced Endothelin-1 Gene Expression in Rat Cardiac Fibroblasts. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 42, no. 10, p. 1845–1854, 2003. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.06.010.

CHOBANIAN, A. v.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T.; ROCCELLA, E. J.; LENFANT, C.; CARTER, B. L.; COHEN, J. D.; COLMAN, P. J.; CZIRAKY, M. J.; DAVIS, J. J.; FERDINAND, K. C.; GIFFORD, R. W.; … KARIMBAKAS, J. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC 7 report. **Journal of the American Medical Association**, vol. 289, no. 19, p. 2560–2572, 21 May 2003. https://doi.org/10.1001/jama.289.19.2560.

COUTINHO, J. V. S.; FREITAS-LIMA, L. C.; FREITAS, F. F. C. T.; FREITAS, F. P. S.; PODRATZ, P. L.; MAGNAGO, R. P. L.; PORTO, M. L.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; BRANDÃO, P. A. A.; CARNEIRO, M. T. W. D.; PAIVA-MELO, F. D.; MIRANDA-ALVES, L.; SILVA, I. v.; GAVA, A. L.; GRACELI, J. B. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, vol. 260, p. 52–69, 2016. DOI 10.1016/j.toxlet.2016.08.007. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.08.007.

CROWLEY, S. D.; COFFMAN, T. M. Recent advances involving the renin-angiotensin system. **Experimental Cell Research**, vol. 318, no. 9, p. 1049–1056, 2012. DOI 10.1016/j.yexcr.2012.02.023. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.023.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, vol. 74, no. 2, p. 323–364, 1994. https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.2.323.

DAS NEVES, V. J.; TANNO, A. P.; CUNHA, T. S.; FERNANDES, T.; GUZZONI, V.; DA SILVA, C. A.; DE OLIVEIRA, E. M.; MOURA, M. J. C. S. J. C. S.; MARCONDES, F. K.; NEVES, V. J.; TANNO, A. P.; CUNHA, T. S.; FERNANDES, T.; GUZZONI, V.; SILVA, C. A.; OLIVEIRA, E. M.; MOURA, M. J. C. S. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β-adrenergic receptors. **Life Sciences**, vol. 92, no. 20–21, p. 1029–1035, 2013. DOI 10.1016/j.lfs.2013.04.002. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.04.002.

DAVID, K.; DINGEMANSE, E.; FREUD, J.; LAQUEUR, E. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, vol. 233, no. 5–6, p. 281–283, 1935. https://doi.org/10.1515/bchm2.1935.233.5-6.281.

DE MEY, S.; THOMAS, J. D.; GREENBERG, N. L.; VANDERVOORT, P. M.; VERDONCK, P. R. Assessment of the time constant of relaxation: insights from simulations and hemodynamic measurements. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, vol. 280, no. 6, p. H2936–H2943, 1 Jun. 2001. DOI 10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2936. Available at: https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2936.

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**, vol. 15, no. 1, p. 12–17, 2000. https://doi.org/10.1053/jcrc.2000.0150012.

DUNI, A.; LIAKOPOULOS, V.; ROUMELIOTIS, S.; PESCHOS, D.; DOUNOUSI, E. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: Untangling ariadne's thread. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 15, p. 1–17, 2019. https://doi.org/10.3390/ijms20153711.

EBENBICHLER, C. F.; STURM, W.; GÄNZER, H.; BODNER, J.; MANGWETH, B.; RITSCH, A.; SANDHOFER, A.; LECHLEITNER, M.; FÖGER, B.; PATSCH, J. R. Flow-

mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. **Atherosclerosis**, vol. 158, no. 2, p. 483–490, 2001. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00465-8.

ESTEBAN, V.; LORENZO, O.; RUPÉREZ, M.; SUZUKI, Y.; MEZZANO, S.; BLANCO, J.; KRETZLER, M.; SUGAYA, T.; EGIDO, J.; RUIZ-ORTEGA, M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-κB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 15, no. 6, p. 1514–1529, 2004. https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000130564.75008.F5.

FANTON, L.; BELHANI, D.; VAILLANT, F.; TABIB, A.; GOMEZ, L.; DESCOTES, J.; DEHINA, L.; BUI-XUAN, B.; MALICIER, D. Heart lesions associated with anabolic steroid abuse : Comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol. 61, p. 317–323, 2009. https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.09.007.

FORTUÑO, A.; BELOQUI, O.; SAN JOSÉ, G.; MORENO, M. U.; ZALBA, G.; DÍEZ, J. Increased phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production in patients with early chronic kidney disease. **Kidney International**, vol. 68, no. SUPPL. 99, p. 71–75, 2005. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.09913.x.

FRANKE, W. W.; BERENDONK, B. Hormonal doping and androgenization of athletes: A secret program of the German Democratic Republic government. 43., 1997. **Clinical Chemistry** [...]. [*S. l.*: *s. n.*], 1997. vol. 43, . https://doi.org/10.1093/clinchem/43.7.1262.

FRANKENFELD, S. P.; OLIVEIRA, L. P.; ORTENZI, V. H.; REGO-MONTEIRO, I. C. C.; CARVALHO, D. P.; FORTUNATO, R. S.; CHAVES, E. A.; FERREIRA, A. C.; LEITAO, A. C. The Anabolic Androgenic Steroid Nandrolone Decanoate Disrupts Redox Homeostasis in Liver , Heart and Kidney of Male Wistar Rats. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 9, p. 1–8, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102699.

FRANQUINI, J. V. M.; NASCIMENTO, A. M.; LIMA, E. M.; BRASIL, G. A.; HERINGER, O. A.; CASSARO, K. O. dos S.; CUNHA, T. V. P.; MUSSO, C.; SANTOS, M. C. L. F. S.; KALIL, I. C.; ENDRINGER, D. C.; BOËCHAT, G. A. P.; BISSOLI, N. S.; ANDRADE, T. U. 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**, 2012. DOI 10.1016/j.steroids.2012.12.009. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.009.

FREEMAN, E. R.; BLOOM, D. A.; MCGUIRE, E. J. A brief history of testosterone. **Journal of Urology**, vol. 165, no. 2, p. 371–373, 2001. https://doi.org/10.1097/00005392-200102000-00004.

FREITAS, F. P. S.; PORTO, M. L.; TRANHAGO, C. P.; PIONTKOWSKI, R.; MIGUEL, E. C.; MIGUEL, T. B.; MARTINS, J. L.; NASCIMENTO, K. S.; BALARINI, C. M.; CAVADA, B. S.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; GAVA, A. L. Dioclea violacea lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury. **American Journal of Translational Research**, vol. 7, no. 12, p. 2573–2588, 2015. .

FÜHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRÜTTGEN, C.-D. Eine einfache colorimetrische Methode zur Inulinbestimmung fOr Nieren-Clearance-Untersuchungen bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. **Klinische Wochenschrift**, vol. 33, no. 29–30, p. 729–730, Aug. 1955. DOI 10.1007/BF01473295. Available at: http://link.springer.com/10.1007/BF01473295.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, vol. 15, no. 6, 2011. https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999.

GALLAGHER, T. F.; KOCH, F. C. The testicular hormone. **The Journal of biological chemistry**, vol. 84, no. 2, p. 495–500, 1929. https://doi.org/10.1210/endo-3-1-16.

GAVA, A. L.; FREITAS, F. P. S.; MEYRELLES, S. S.; SILVA, I. v.; GRACELI, J. B. Gender-dependent effects of aging on the kidney. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 44, no. 9, p. 905–913, 2011. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500101.

GELMANN, E. P. Molecular biology of the androgen receptor. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 20, no. 13, p. 3001–3015, 2002. https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.018.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. **Circulation**, vol. 108, no. 16, p. 1912–1916, 2003. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB.

GROKETT, B. H.; AHMAD, N.; WARREN, D. W. The effects of an anabolic steroid (oxandrolone) on reproductive development in the male rat. **Acta Endocrinologica**, vol. 126, no. 2, p. 173–178, 1992. https://doi.org/10.1530/acta.0.1260173.

HALLGREN, M.; KRAEPELIEN, M.; ÖJEHAGEN, A.; LINDEFORS, N.; ZEEBARI, Z.; KALDO, V.; FORSELL, Y. Physical exercise and internet-based cognitive-behavioural therapy in the treatment of depression: Randomised controlled trial. **British Journal of Psychiatry**, vol. 207, no. 3, p. 227–234, 2015. https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.160101.

HAMLIN, R. L.; DEL RIO, C. dP/dtmax - A measure of “baroinometry.” **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, vol. 66, no. 2, p. 63–65, 2012. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.01.001.

HANDELSMAN, D. J. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. **Endocrinology: Adult and Pediatric**, vol. 2–2, 2020. .

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. **Sports Medicine**, vol. 34, no. November, p. 513–554, 2014. https://doi.org/10.2165/00007256-200434080-00003.

HOSEINI, L.; ROOZBEH, J.; SAGHEB, M.; KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. **Micron**, vol. 40, no. 2, p. 226–230, 2009. https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.08.004.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev Bras Hipertens**, vol. 8, no. 1, p. 55–62, 2001. .

KHO, C.; LEE, A.; HAJJAR, R. J. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling - Targets for heart failure therapy. **Nature Reviews Cardiology**, vol. 9, no. 12, p. 717–733, 2012. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.145.

KINDERMANN, W. Kardiovaskuläre nebenwirkungen von anabol-androgenen steroiden. **Herz**, vol. 31, no. 6, p. 566–573, 2006. https://doi.org/10.1007/s00059-006-2856-0.

KLIPPEL, B. F.; DUEMKE, L. B.; LEAL, M. A.; FRIQUES, A. G. F.; DANTAS, E. M.; DALVI, R. F.; GAVA, A. L.; PEREIRA, T. M. C.; ANDRADE, T. U.; MEYRELLES, S. S.; CAMPAGNARO, B. P.; VASQUEZ, E. C. Effects of kefir on the cardiac autonomic tones and baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, vol. 7, no. JUN, 2016. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00211.

KRIEGER, E. M. Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. **The American journal of physiology**, vol. 218, no. 2, p. 486–490, 1970. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.218.2.486.

LAI, E. Y.; SOLIS, G.; LUO, Z.; CARLSTROM, M.; SANDBERG, K.; HOLLAND, S.; WELLSTEIN, A.; WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. P47 phox is required for afferent arteriolar contractile responses to angiotensin II and perfusion pressure in mice. **Hypertension**, vol. 59, no. 2 SUPPL. 1, p. 415–420, 2012. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.184291.

LANDGRAF, S. S.; SILVA, L. S.; PERUCHETTI, D. B.; SIRTOLI, G. M.; MORAES-SANTOS, F.; PORTELLA, V. G.; SILVA-FILHO, J. L.; PINHEIRO, C. S.; ABREU, T. P.; TAKIYA, C. M.; BENJAMIN, C. F.; PINHEIRO, A. A. S.; CANETTI, C.; CARUSO-NEVES, C. 5-Lypoxygenase products are involved in renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in proximal tubules in mice. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 10, p. 1–13, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107549.

LANE, H. A.; GRACE, F.; SMITH, J. C.; MORRIS, K.; COCKCROFT, J.; SCANLON, M. F.; DAVIES, J. S. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. **European Journal of Clinical Investigation**, vol. 36, no. 7, p. 483–488, 2006. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01667.x.

LEITE-MOREIRA, A. F.; GILLEBERT, T. C. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. **Circulation**, vol. 90, no. 5, p. 2481–2491, 1994. https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.5.2481.

LI ZHOU, L.; HOU, F. F.; WANG, G. B.; YANG, F.; XIE, D.; WANG, Y. P.; TIAN, J. W. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and

deletion through NADPH-dependent mechanisms. **Kidney International**, vol. 76, no. 11, p. 1148–1160, 2009. DOI 10.1038/ki.2009.322. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/ki.2009.322.

LIMA, E. M.; CASSARO, K. O. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M. de A.; POLTRONIERI, M. P.; NASCIMENTO, A. M.; ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S.; BRASIL, G. A. Eight weeks of treatment with nandrolone decanoate in female rats promotes disruption in the redox homeostasis and impaired renal function. **Life Sciences**, vol. 242, no. December 2019, p. 117227, 2020. DOI 10.1016/j.lfs.2019.117227. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117227.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; BRASIL, G. A.; KALIL, I. C.; LENZ, D.; ENDRINGER, D. C.; ANDRADE, T. U.; BISSOLI, N. S. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: Response to resistance training in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, vol. 93, no. 11, p. 985–991, 2015. DOI 10.1139/cjpp-2015-0014. Available at: http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2015-0014%0Ahttps://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84945338072&partnerID=40&md5=6652ac6833b08a3a20157338e6c669e3.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K. U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging treat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 18, no. 7, p. 1272–1280, 2003. https://doi.org/10.1093/ndt/gfg074.

LORELL, B. H. Significance of diastolic dysfunction of the heart. **Annual Review of Medicine**, vol. 42, p. 411–436, 1991. https://doi.org/10.1146/annurev.me.42.020191.002211.

LUMIA, A. R.; MCGINNIS, M. Y. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. **Physiology and Behavior**, vol. 100, no. 3, p. 199–204, 2010. DOI 10.1016/j.physbeh.2010.01.007. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.007.

MACCARTHY, P. A.; GRIEVE, D. J.; LI, J. M.; DUNSTER, C.; KELLY, F. J.; SHAH, A. M. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: Role

of reactive oxygen species and NADPH oxidase. **Circulation**, vol. 104, no. 24, p. 2967–2974, 2001. https://doi.org/10.1161/hc4901.100382.

MADY, C.; IANNI, B. M.; ARTEAGA, E.; MONTES, G. S.; CALDINI, E. G.; ANDRADE, G.; GIORGI, M. C. P.; SALDIVA, P. H. N. Relation Between Interstitial Myocardial Collagen and the Degree of Clinical Impairment in Chagas ' Disease. **The American Journal of Cardiology**, vol. 84, no. 99, p. 354–356, 1999. .

MAFHAM, M.; EMBERSON, J.; LANDRAY, M. J.; WEN, C. P.; BAIGENT, C. Estimated glomerular filtration rate and the risk of major vascular events and all-cause mortality: A meta-analysis. **PLoS ONE**, vol. 6, no. 10, 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025920.

MARSH, J. D.; LEHMANN, M. H.; RITCHIE, R. H.; GWATHMEY, J. K.; GREEN, G. E.; SCHIEBINGER, R. J. Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes. **Circulation**, vol. 98, no. 3, p. 256–261, 2012. https://doi.org/10.1161/01.cir.98.3.256.

MATSUSHITA, K.; VAN DER VELDE, M.; ASTOR, B. C.; WOODWARD, M.; LEVEY, A. S.; DE JONG, P. E.; CORESH, J.; GANSEVOORT, R. T.; EL-NAHAS, M.; ECKARDT, K. U.; KASISKE, B. L.; TONELLI, M.; HEMMELGARN, B.; WANG, Y.; ATKINS, R. C.; POLKINGHORNE, K. R.; CHADBAN, S. J.; SHANKAR, A.; KLEIN, R.; … MANLEY, T. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. **The Lancet**, vol. 375, no. 9731, p. 2073–2081, 2010. DOI 10.1016/S0140-6736(10)60674-5. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60674-5.

MCPHAUL, M. J.; YOUNG, M. Complexities of androgen action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, vol. 45, no. 3 SUPPL., p. 87–94, 2001. https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117429.

MEDEI, E.; MAROCOLO, M.; RODRIGUES, D. de C.; ARANTES, P. C.; TAKIYA, C. M.; SILVA, J.; RONDINELLI, E.; GOLDENBERG, R. C. dos S.; DE CARVALHO, A. C. C.; NASCIMENTO, J. H. M. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: Cellular, ionic and molecular mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, vol. 49, no. 2, p. 165–175, 2010. DOI

10.1016/j.yjmcc.2010.04.014. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.04.014.

MELCHERT, R. B.; WELDER, A. A. Cardiovascular effects of anclrogenic-anabolic steroids. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, vol. 27, no. 9, p. 1252–1262, Sep. 1995. DOI 10.1249/00005768-199509000-00004. Available at: http://journals.lww.com/00005768-199509000-00004.

MELO JUNIOR, A. F.; DALPIAZ, P. L. M. M.; SOUSA, G. J.; OLIVEIRA, P. W. C.; BIROCALE, A. M.; ANDRADE, T. U.; ABREU, G. R.; BISSOLI, N. S.; MELO, A. F.; DALPIAZ, P. L. M. M.; SOUSA, G. J.; WENDELL, P.; OLIVEIRA, C.; BIROCALE, A. M.; ANDRADE, T. U.; ABREU, G. R. Nandrolone alter left ventricular contractility and promotes remodelling involving calcium-handling proteins and renin-angiotensin system in male SHR. **Life Sciences**, vol. 208, no. July, p. 239–245, 2018. DOI 10.1016/j.lfs.2018.07.041. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.041.

MENKE, L. A.; SAS, T. C. J.; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. P. F.; ZANDWIJKEN, G. R. J.; DE RIDDER, M. A. J.; ODINK, R. J.; JANSEN, M.; DE DELEMARRE-VAN WAAL, H. A.; STOKVIS-BRANTSMA, W. H.; WAELKENS, J. J.; WESTERLAKEN, C.; REESER, H. M.; VAN TROTSENBURG, A. S. P.; GEVERS, E. F.; VAN BUUREN, S.; DEJONCKERE, P. H.; HOKKEN-KOELEGA, A. C. S.; OTTEN, B. J.; WIT, J. M. Efficacy and safety of oxandrolone in growth hormone-treated girls with turner syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 95, no. 3, p. 1151–1160, 2010. https://doi.org/10.1210/jc.2009-1821.

MENKE, L. A.; SAS, T. C. J.; VAN KONINGSBRUGGE, S. H. L.; DE RIDDER, M. A. J.; ZANDWIJKEN, G. R. J.; BOERSMA, B.; DEJONCKERE, P. H.; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. P. F.; OTTEN, B. J.; WIT, J. M. The effect of oxandrolone on voice frequency in growth hormone-treated girls with turner syndrome. **Journal of Voice**, vol. 25, no. 5, p. 602–610, 2011. DOI 10.1016/j.jvoice.2010.06.002. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2010.06.002.

MEZZANO, D.; PAIS, E. O.; ARANDA, E.; PANES, O.; DOWNEY, P.; ORTIZ, M.; TAGLE, R.; GONZÁLEZ, F.; QUIROGA, T.; CACERES, M. S.; LEIGHTON, F.; PEREIRA, J. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. **Kidney International**, vol. 60, no. 5, p. 1844–1850, 2001. https://doi.org/10.1016/s0085-2538(15)48065-2.

MIHL, C.; DASSEN, W. R. M.; KUIPERS, H. Cardiac remodelling: Concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. **Netherlands Heart Journal**, vol. 16, no. 4, p. 129–133, 2008. https://doi.org/10.1007/BF03086131.

MILLER, W. L. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. vol. 9, no. 3, p. 295–318, 1988. .

NASCIMENTO, A. M. do; LIMA, E. M. de; BRASIL, G. A.; CALIMAN, I. F.; SILVA, J. F. da; LEMOS, V. S.; ANDRADE, T. U. de; BISSOLI, N. S. 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**, vol. 301, p. 22–30, 2016. DOI 10.1016/j.taap.2016.04.001. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.001.

NASCIMENTO, J. H. M.; MEDEI, E. Cardiac effects of anabolic steroids: hypertrophy, ischemia and electrical remodelling as potential triggers of sudden death. **Mini reviews in medicinal chemistry**, vol. 11, no. 5, p. 425–9, 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443509.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, New York, vol. 39, no. 2 Suppl 1, p. S1-266, Feb. 2002. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904577.

NETO, W. K.; GAMA, E. F.; ROCHA, L. Y.; RAMOS, C. C.; TAETS, W.; SCAPINI, K. B.; FERREIRA, J. B.; RODRIGUES, B.; CAPERUTO, É. Effects of testosterone on lean mass gain in elderly men: systematic review with meta-analysis of controlled and randomized studies. **AGE**, vol. 37, no. 1, p. 5, 1 Feb. 2015. DOI 10.1007/s11357-014-9742-0. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11357-014-9742-0.

OBERG, B. P.; MCMENAMIN, E.; LUCAS, F. L.; MCMONAGLE, E.; MORROW, J.; IKIZLER, T. A.; HIMMELFARB, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney International**, vol. 65, no. 3, p. 1009–1016, Mar. 2004. DOI 10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815497947.

OGURA, S.; SHIMOSAWA, T. Oxidative stress and organ damages. **Current Hypertension Reports**, vol. 16, no. 8, p. 1–5, 2014. https://doi.org/10.1007/s11906-014-0452-x.

OLIVARES, E. L.; SILVEIRA, A. L. B.; FONSECA, F. v.; SILVA-ALMEIDA, C.; CÔRTES, R. S.; PEREIRA-JUNIOR, P. P.; NASCIMENTO, J. H. M.; REIS, L. C. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. **Physiology and Behavior**, vol. 126, p. 15–24, 2014. DOI 10.1016/j.physbeh.2013.12.006. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.006.

ORR, R.; SINGH, M. F. The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders: Review of efficacy and safety. **Drugs**, vol. 64, no. 7, p. 725–750, 2004. https://doi.org/10.2165/00003495-200464070-00004.

PAREKH, A. B.; PUTNEY, J. W. Store-operated calcium channels. **Physiological Reviews**, vol. 85, no. 2, p. 757–810, 2005. https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003.

PATOČKOVÁ, J.; KRŠIAK, M.; MARHOL, P.; TŮMOVÁ, E. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. **Physiological Research**, vol. 52, no. 4, p. 455–460, 2003. .

PIACENTINO, D.; KOTZALIDIS, G.; CASALE, A.; AROMATARIO, M.; POMARA, C.; GIRARDI, P.; SANI, G. Anabolic-androgenic Steroid use and Psychopathology in Athletes. A Systematic Review. **Current Neuropharmacology**, vol. 13, no. 1, p. 101–121, 2015. DOI 10.2174/1570159X13666141210222725. Available at: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-159X&volume=13&issue=1&spage=101.

POZZI, R.; FERNANDES, K. R.; DE MOURA, C. F. G.; FERRARI, R. A. M.; FERNANDES, K. P. S.; RENNO, A. C. M.; RIBEIRO, D. A. Nandrolone decanoate induces genetic damage in multiple organs of rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 64, no. 3, p. 514–518, 2013. https://doi.org/10.1007/s00244-012-9848-2.

RANKE, M. B. Treatment of children and adolescents with idiopathic short stature. **Nature Reviews Endocrinology**, vol. 9, no. 6, p. 325–334, 2013. DOI 10.1038/nrendo.2013.71. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.71.

RIEZZO, I.; TURILLAZZI, E.; BELLO, S.; CANTATORE, S.; CERRETANI, D.; DI PAOLO, M.; FIASCHI, A. I.; FRATI, P.; NERI, M.; PEDRETTI, M.; FINESCHI, V. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF-α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 280, no. 1, p. 97–106, 2014. DOI 10.1016/j.taap.2014.06.031. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.031.

ROCHA, F. L.; CARMO, E. C.; ROQUE, F. R.; HASHIMOTO, N. Y.; ROSSONI, L. v.; FRIMM, C.; ANÉAS, I.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, J. E.; OLIVEIRA, E. M. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, vol. 293, no. 6, p. 3575–3583, 2007. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01251.2006.

RODRIGUEZ-ITURBE, B.; ZHAN, C. de; QUIROZ, Y.; SINDHU, R. K.; VAZIRI, N. D. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, vol. 41, no. 2, p. 341–346, 2003. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000052833.20759.64.

ROMANOSKY, A. J.; GIAIMO, M. E.; SHEPHERD, R. E.; BURNS, A. H. The effect of in vivo endotoxin on myocardial function in vitro. **Circ Shock**, vol. 19, p. 1–11, 1986. .

RONCHI, S. N.; MASS, E. M. S. W. der; BERNARDINA, N. R. D.; MELO JÚNIOR, A. F. de; SANTOS, W. C. dos; ANDRADE, T. U. de; BRASIL, G. A.; BISSOLI, N. S. Low and high doses of oxandrolone promote pathological cardiac remodeling in young male rats. **Steroids**, vol. 170, no. August 2020, p. 108814, Jun. 2021. DOI 10.1016/j.steroids.2021.108814. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X2100026X.

ROUMELIOTIS, S.; ELEFTHERIADIS, T.; LIAKOPOULOS, V. Is oxidative stress an issue in peritoneal dialysis? **Seminars in Dialysis**, vol. 32, no. 5, p. 463–466, 2019. https://doi.org/10.1111/sdi.12818.

RUZICKA, L.; WETTSTEIN, A. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). **Helvetica**, vol. 18, no. 1, p. 1264–1275, 1935. .

SAS, T. C. J.; GAULT, E. J.; ZEGER BARDSLEY, M.; MENKE, L. A.; FRERIKS, K.; PERRY, R. J.; OTTEN, B. J.; DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. P. F.; TIMMERS, H.; WIT, J. M.; ROSS, J. L.; DONALDSON, M. D. C. Safety and efficacy of oxandrolone in growth hormone-treated girls with turner syndrome: Evidence from recent studies and recommendations for use. **Hormone Research in Paediatrics**, vol. 81, no. 5, p. 289–297, 2014. https://doi.org/10.1159/000358195.

SCHNACKENBERG, C. G.; WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in shr with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic role of nitric oxide. **Hypertension**, vol. 32, no. 1, p. 59–64, 1998. https://doi.org/10.1161/01.HYP.32.1.59.

SEARA, F. de A. C.; BARBOSA, R. A. Q.; DE OLIVEIRA, D. F.; GRAN DA SILVA, D. L. S.; CARVALHO, A. B.; FREITAS FERREIRA, A. C.; MATHEUS NASCIMENTO, J. H.; OLIVARES, E. L. Administration of anabolic steroid during adolescence induces long-term cardiac hypertrophy and increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult Wistar rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 171, p. 34–42, 2017. DOI 10.1016/j.jsbmb.2017.01.012. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.012.

SEGALL, L.; NISTOR, I.; COVIC, A. Heart Failure in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Integrative Review. **BioMed Research International**, vol. 142, no. 11–12, p. 747–755, 2014. DOI 10.2298/SARH1412747P. Available at: http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0370-81791412747P.

SELMECI, L. Advanced oxidation protein products (AOPP): Novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? **Free Radical Research**, vol. 45, no. 10, p. 1115–1123, 2011. https://doi.org/10.3109/10715762.2011.602074.

SHEPHARD, R. J.; BALADY, G. J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, vol. 99, no. 7, p. 963–972, 1999. https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.7.963.

SHEPHERD, J. T.; MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, vol. 105, p. 1–99, 1986. https://doi.org/10.1007/bfb0034497.

SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, vol. 17, no. 4, p. 311–321, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x.

STRÅLIN, P.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B. O.; MARKLUND, S. L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 15, no. 11, p. 2032–2036, 1995. https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.11.2032.

SWERDLOFF, R. S.; WANG, C.; BHASIN, S. 10 Developments in the control of testicular function. **Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 6, no. 2, p. 451–483, 1992. https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80158-2.

TANNO, A. P.; NEVES, V. J. das; ROSA, K. T.; CUNHA, T. S.; GIORDANO, F. C. L.; CALIL, C. M.; GUZZONI, V.; FERNANDES, T.; DE OLIVEIRA, E. M.; NOVAES, P. D.; IRIGOYEN, M. C.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: Role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. **Life Sciences**, vol. 89, no. 17–18, p. 631–637, 2011. DOI 10.1016/j.lfs.2011.08.004. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.08.004.

THIBLIN, I.; GARMO, H.; GARLE, M.; HOLMBERG, L.; BYBERG, L.; MICHAËLSSON, K.; GEDEBORG, R. Anabolic steroids and cardiovascular risk: A national population-based cohort study. **Drug and Alcohol Dependence**, vol. 152, p. 87–92, 2015. DOI 10.1016/j.drugalcdep.2015.04.013. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.04.013.

TORRISI, M.; PENNISI, G.; RUSSO, I.; AMICO, F.; ESPOSITO, M.; LIBERTO, A.; COCIMANO, G.; SALERNO, M.; ROSI, G. L.; NUNNO, N. di; MONTANA, A. Sudden cardiac death in anabolic-androgenic steroid users: A literature review. **Medicina (Lithuania)**, vol. 56, no. 11, p. 1–19, 2020. https://doi.org/10.3390/medicina56110587.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**, vol. 122, no. 4, p. 339–352, 2004. https://doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7.

TOUYZ, Rhian M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: Implications in human hypertension. **Hypertension Research**, vol. 34, no. 1, p. 5–14, 2011. DOI 10.1038/hr.2010.201. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/hr.2010.201.

TRUJILLO, J.; MOLINA-JIJÓN, E.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, R.; REYES, J. L.; LOREDO, M. L.; BARRERA-OVIEDO, D.; PINZÓN, E.; RODRÍGUEZ-RANGEL, D. S.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: Relation to oxidative stress. **Food and Function**, vol. 7, no. 1, p. 279–293, 2016. https://doi.org/10.1039/c5fo00624d.

TUCKER, P. S.; SCANLAN, A. T.; DALBO, V. J. Chronic kidney disease influences multiple systems: Describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2015, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/806358.

TURILLAZZI, E.; PERILLI, G.; DI PAOLO, M.; NERI, M.; RIEZZO, I.; FINESCHI, V. Side Effects of AAS Abuse: An Overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 11, no. 5, p. 374–389, 2011. https://doi.org/10.2174/138955711795445925.

WANG, G.; ANRATHER, J.; HUANG, J.; SPETH, R. C.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. **Journal of Neuroscience**, vol. 24, no. 24, p. 5516–5524, 2004. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-04.2004.

XU, L.; FREEMAN, G.; COWLING, B. J.; SCHOOLING, C. M. Testosterone therapy and cardiovascular events among men : a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. **BMC Medicine**, vol. 11, no. 108, p. 1–12, 2013.
.

ZALBA, G.; FORTUÑO, A.; DÍEZ, J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 21, no. 10, p. 2686–2690, 2006. https://doi.org/10.1093/ndt/gfl398.

ZHOU, L.; CHEN, X.; LU, M.; WU, Q.; YUAN, Q.; HU, C.; MIAO, J.; ZHANG, Y.; LI, H.; HOU, F. F.; NIE, J.; LIU, Y. Wnt/β-catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria. **Kidney International**, vol. 95, no. 4, p. 830–845, Apr. 2019. DOI 10.1016/j.kint.2018.10.032. Available at: https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.032.

ZOUBOULIS, C. C.; DEGITZ, K. Androgen action on human skin -- from basic research to clinical significance. **Experimental dermatology**, vol. 13 Suppl 4, p. 5–10, 2004. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2004.00255.x.

8. APÊNDICE

Steroids 170 (2021) 108814

Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

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

Low and high doses of oxandrolone promote pathological cardiac remodeling in young male rats

Silas Nascimento Ronchi [a], Edgar Mendes Souza Wan Mass [a], Nara Rubia Dalla Bernardina [a], Antonio Ferreira de Melo Júnior [a], Wedson Correa dos Santos [b], Tadeu Uggere de Andrade [b], Girlandia Alexandre Brasil [b,*], Nazaré Souza Bissoli [a]

[a] Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil
[b] Pharmaceutical Sciences Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Anabolic androgenic steroid
Cardiac remodeling
Cardiac contractility
Angiotensin-converting enzyme
Renin-angiotensin system
Oxidative stress

ABSTRACT

Oxandrolone (OXA) used in clinical practice, however, its misuse is frequent, including by adolescents pursuing an aesthetic goal. However, the impacts of noxious doses on the cardiovascular system remain unknown.
Aim: To investigate cardiac effects of OXA in low (LD) and high (HD) doses.
Methods: Male Wistar prepubescent rats were separated into 3 experimental groups: control (CON), LD, and HD. Only the CON group received the carrier (carboxymethylcellulose, 0.5%), while the LD and HD groups received, respectively, 2.5 and 37.5 mg/kg/day of OXA *via* gavage for 4 weeks. The hemodynamic parameters (+dP/dtmax, −dP/dtmin, and Tau) and cardiac autonomic tonus were assessed. Hearts were retrieved for histological analyses and oxidative stress evaluation. Expression levels of calcium-handling proteins were measured by western blot.
Results: The OXA treatment changed neither the cardiac contractility nor the cardiac autonomic tonus. However, cardiac hypertrophy, collagen deposition, and increased angiotensin-converting enzyme (ACE) expression were observed in a dose-dependent way. Also, the p-phospholamban (p-PLB)/PLB ratio was observed to decrease and increase, respectively, in the LD and HD groups; the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a)/PLB ratio being higher in both groups. OXA increased SOD1 expression and decreased catalase expression only in the LD group, and protein oxidation was increased in HD.
Conclusion: Both doses of OXA could promote pathological cardiac remodeling, probably via increased ACE, and these effects were exacerbated in the HD treatment, but cardiac contractility was not affected regardless of the dose.

Neuroscience Letters 761 (2021) 136104

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

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

Research article

Oxandrolone treatment in juvenile rats induced anxiety-like behavior in young adult animals

Nara Rubia D. Bernardina [a], Randriely Merscher Sobreira de Lima [b], Silas N. Ronchi [a], Edgar M. Wan Der Mass [a], Glauciene J. Souza [a], Livia C. Rodrigues [a], Nazaré S Bissoli [a], Girlandia A. Brasil [c,*]

[a] Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil
[b] Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
[c] Pharmaceutical Sciences Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Behavior
Oxandrolone
Juvenile rats
Anxiety

ABSTRACT

Aims: Oxandrolone (OXA) is a synthetic steroid used for the treatment of clinical conditions associated with catabolic states in humans, including children. However, its behavioral effects are not well known. Our goal was to evaluate the anxiety-like behavior induced in young adult rats after the treatment of juvenile animals with OXA.

Methods: Four-week-old male rats were separated into three groups: Control (CON), therapeutic-like OXA dose (TD), and excessive OXA dose (ED), in which 2.5 and 37.5 mg/kg/day of OXA were administered via gavage for four weeks for TD and ED, respectively. Behavior was evaluated through the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) tests. Protein expression of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), Tumor necrosis factor-α (TNF-α), and dopamine receptor 2 (DrD2) were analyzed in tissue samples of the hippocampus, amygdala, and pre-frontal cortex by Western Blot.

Results: OXA induced anxiety-like behaviors in both TD and ED animals; it decreased the time spent in the open arms of the EPM in both groups and reduced the time spent in the central zone of the OF in the TD group. In the hippocampus, CAT expression was higher in TD compared with both control and ED animals. No differences were found in the amygdala and prefrontal cortex. TNF-α, SOD, and DrD2 levels were not altered in any of the assessed areas.

Conclusions: Treatment of juvenile rats with OXA led to anxiety-like behavior in young adult animals regardless of the dose used, with minor changes in the antioxidant machinery located in the hippocampus.

BJPS

Brazilian Journal of
Pharmaceutical Sciences

http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902020000419177

Article

Chronic and acute effects of kefir: the role of angiotensin converting enzyme inhibition instead of nitric oxide balance

Tadeu Uggere de Andrade[1], Karolina Silva Schumacker[1], Karina Silva Schumacker[1], Gabriela Coutinho[1], Mahira Sabino Rezende[1], Silas Nascimento Ronchi[2], Ieda Carneiro Kalil[1], Mirian de Almeida Silva-Cutini[1], Ewelyne Miranda de Lima[1], June Ferreira Maia[1], Girlandia Alexandre Brasil[1*]

[1]Pharmaceutical Sciences Graduate Program, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil, [2]Physiological Sciences Department, Health Sciences Center Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

Probiotic consumption promotes numerous health benefits. The aim of this study is 1) to evaluate the antihypertensive effect of kefir in a hypertension rat model caused by the administration of the nitric oxide synthesis inhibitor, L-NAME, and 2) to evaluate the acute angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the soluble nonbacterial fraction (SNBF) of kefir. To develop the first aim, male rats were separated into three groups: control group (C) treated with 0.3 mL/100 g of milk; L-NAME group (LN) received 10 mg/kg of said inhibitor; and Kefir group (K) treated with 0.3 mL/100 g of kefir plus L-NAME (10 mg/kg of said inhibitor). The treatments were given by oral gavage twice a day for four weeks. For the second aim"instead additionally, male rats received angiotensin I (*in bolus*) in three doses (Ang I: 0.03, 3 and 300 µg/kg) and were separated into two groups: a) received captopril (30 mg/kg i.v.) and b)received SNBF of kefir (5 mL/kg i.v.). Blood pressure were evaluated before and after Ang I. After treatment, hemodynamic parameters were evaluated, heart weight was recorded, and body weight gain was calculated. SNBF of kefir did not decrease the blood pressure for L-NAME-treated animals, and no changes were observed in the cardiac parameters. However, the SNBF of kefir demonstrated acute inhibition of ACE *in vivo* similar to that of captopril. Thus, our results suggest that kefir may improve human cardiovascular systems by using mechanisms independent of nitric oxide syntheses. Additionally, the renin angiotensin system is probably the most important system involved in kefir effect regarding hypertension.

Keywords: Nitric oxide. Blood pressure. Probiotic. ACE inhibition. Soluble nonbacterial fraction.