UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO BIOMÉDICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JOÃO VICENTE MAGGIONI FRANQUINI

Nandrolona Determina Desequilíbrio das Citocinas
Inflamatórias e Aumento da Atividade da ECA Cardíaca,
Acarretando Remodelamento e Injuria Cardíaca, Redução
da Sensibilidade do RBJ e Desenvolvimento de
Hipertensão.

VITÓRIA 2012

JOÃO VICENTE MAGGIONI FRANQUINI

Nandrolona Determina Desequilíbrio das Citocinas
Inflamatórias e Aumento da Atividade da ECA Cardíaca,
Acarretando Remodelamento e Injuria Cardíaca, Redução
da Sensibilidade do RBJ e Desenvolvimento de
Hipertensão.

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas do Cento Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Nazaré de Souza Bissoli

JOÃO VICENTE MAGGIONI FRANQUINI

Nandrolona Determina Desequilíbrio das Citocinas Inflamatórias e Aumento da Atividade da ECA Cardíaca, Acarretando Remodelamento e Injuria Cardíaca, Redução da Sensibilidade do RBJ e Desenvolvimento de Hipertensão.

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas do Cento Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Titulo de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em 20 de Dezembro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa Dra Nazaré de Souza Bissoli Universidade Federal do Espírito Santo Orientador Prof. Dra Tadeu Uggere de Andrade Universidade Federal do Espírito Santo Universidade Vila Velha Co-orientador Prof. Dra Wellington Lunz Universidade Federal do Espírito Santo Examinador Prof. Dra Sônia Alves Gouvea Universidade Federal do Espírito Santo Examinador Prof. Dra Jonis..... Universidade Federal do Espírito Santo

Examinador

RESUMO

Os objetivos do estudo foram investigar o prejuízo produzido pelo Decanoato de Nandrolona (DN) no reflexo Bezold-Jarisch (BJR) na dose de 20mg/Kg, e examinar os efeitos cardiotóxicos do DN com essa dose. Foram administrados em oito ratos wistar machos DN (20mg/Kg; DECA) ou veículo (animais controles; CONT) durante 4 semanas. Após o período de tratamento, o RBJ foi avaliado pela mensuração das repostas hipotensoras e a bradicardia que eram provocadas pela administração de serotonina (2–32 µg/kg). A pressão arterial média (PAM) foi avaliada e a hipertrofia dos miócitos cardíacos foi determinada pela relação massa do coração/massa corporal (COR/MC) e análises morfométricas. Deposição de colágeno na matriz extra celular (MEC) por análise histológica de amostras coradas em vermelho por picrosirius. Níveis de citocinas inflamatórias cardíacas e atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) foram avaliados juntamente com o biomarcador de lesão cardíaca, troponina I. Animais do grupo DECA mostraram aumento da deposição de colágeno tipo I na matriz (p < 0.01) e da atividade da ECA cardíaca (p < 0.01) comparado com o grupo CONT. Interleucina (IL)-10 estava reduzida (p < 0.01) e os níveis de citocina pró-inflamatórias (TNF- α and IL-6; p < 0.01) apresentaram-se elevados no grupo DECA em relação ao grupo CONT. Foi observada injúria cardíaca no grupo DECA pela observação da redução da troponina cardíaca I (p < 0.01). Os animais do grupo DECA também desenvolveram hipertrofia cardíaca (CONT: 3,13±0,07 mg/g vs DECA: 3,79±0,12 mg/g; p < 0.01) e redução da sensibilidade do RBJ. A PAM dos animais tratados com DECA atingiram níveis hipertensivos comparada aoo grupo controle (CONT: 99±2 mmHg vs DECA: 148±7 mmHg; p<0,01). Concluímos que a dose de 20mg/Kg de DN provoca efeitos carditóxicos, com remodelamento e injúria cardíaca. Essas alterações cardíacas reduzem a sensibilidade do RBJ. Juntas, essas anormalidades contribuem para o desenvolvimento de hipertensão nos animais do grupo DECA.

Palavras chaves: Agentes anabólicos; IL-10; IL-6; TNF-α; reflexo cardiopulmonar; Troponina I.

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate the damage produced by nandrolone decanoate (ND)-blunting of the Bezold-Jarisch reflex (BJR) at dose 20mg/kg, and to examine the cardiotoxic effects of ND at this dosage. Male Wistar rats were administered either ND (20 mg/kg; DECA) or vehicle (control animals; CONT) for 4 weeks. After the treatment period, the BJR was evaluated by measuring the bradycardia and hypotension responses that were elicited by serotonin administration (2–32 µg/kg). Mean arterial pressure (MAP) was assessed and myocyte hypertrophy was determined by the heart mass/body mass (HM/BM) ratio and by morphometric analysis. Matrix collagen deposition was assessed by histological analysis of the picrosirius red-stained samples. Cardiac inflammatory cytokine levels and angiotensin-converting enzyme (ACE) activity were evaluated as well the biomarker of cardiac lesion, troponin I. Animals from the DECA group showed enhancement of matrix type I collagen deposition (p < 0.01) and cardiac ACE activity (p < 0.01) compared with the CONT group. Interleukin (IL)-10 was reduced (p < 0.01) and the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6; p < 0.01) were augmented in the DECA group in comparison with the CONT group. Cardiac injury was observed in the DECA group by the reduction in cardiac troponin I (p < 0.01) compared with the CONT group. Animals in the DECA group also developed cardiac hypertrophy (CONT: $3,13\pm0,07$ mg/g vs DECA: $3,79\pm0,12$ mg/g; p < 0.01) and reduction of BJR sensitivity. The MAP of animals treated with ND reached hypertensive levels compared with the CONT group (CONT: 99±2 mmHg vs DECA: 148±7 mmHg; p<0,01; p < 0.01;). We conclude that the dose of 20mg/kg of ND elicit cardiotoxic effects with cardiac remodelling and injury. Cardiac changes reduce the BJR sensitivity in a dose-dependent manner. Together, these abnormalities contributed to the development of hypertension in animals in the DECA group.

Key words: Anabolic agents; IL-10; IL-6; TNF-α; Cardiopulmonary reflex; Troponin I.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AMPC ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO

ANG I E II ANGIOTENSINA I E II

ANOVA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

AT1 RECEPTOR DE ANGIOTENSINA 1

CEBRID CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS

CK-MB CREATINO KINASE - MB

CONT GRUPO CONTROLE

DECA GRUPO QUE RECEBEU DECANOATO DE NANDROLONA

DHT DIHIDROTESTOSTERONA

DN DECANOATO DE NANDROLONA

EAA ESTERÓIDE ANABÓLICO ANDROGÊNICO

ECA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

FC FREQUÊNCIA CARDÍACA

HDL LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE

IAM INSUFICIÊNCIA AGUDA DO MIOCÁRDIO

IC INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

ICAM MOLÉCULAS DE ADESÃO INTRACELULAR

IL INTERLEUCINA

LDL LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

MCF MASSA COPORAL FINAL

MI MASSA INICIAL

MF MASSA FINAL

MPP METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

PA PRESSÃO ARTERIAL

PAD PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA

PAM PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

PK A E B PROTEÍNA KINASE A E B

RBJ REFLEXO BEZOLD-JARISH

SRA SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

TNF-α FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

VE VENTRÍCULO ESQUERDO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – PAM e FC dos grupos	27
Figura 2 – Reflexo Bezold-Jarish	.29
Figura 3 – Avaliação da hipertrofia cardíaca	.31
Figura 4 – Análise histológica	32
Figura 5 – Citocinas e atividade da ECA	.33
Figura 6 – Troponina I e β-actina	.34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação massa cardíaca massa corporal	3	C)
--	---	---	---

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIAÇÕES	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)	10
1.2 EAA E CONTROLE REFLEXO DA PRESSÃO ARTERIAL	13
1.3 EAA E MARCADORES DE LESÃO CARDÍACA	14
1.4 EAA E CITOCINAS	15
1.5 EAA E SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS GERAIS	20
2.2 OJETIVOS ESPECIFÍCOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	
3.2 ANÁLISE HEMODINÂMICA	22
3.3 AVALIAÇÃO DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH (RBJ)	23
3.4 ESTIMATIVA DA HIPERTROFIA CARDÍACA E DETERMINAÇÃO DA	MASSA
CORPORAL FINAL	23
3.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E HISTOLÓGICAS	23
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE	
ANGIOTENSINA (ECA)	24
3.7 DOSAGEM DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS CARDÍACAS E ATIVI	DADE
DA ECA	25
3.8 ANÁLISE POR WESTERN BLOT DA TROPONINA I CARDÍACA	25
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	27
4.2 REELEYO REZOLD _ IARISCH (RR I)	28

7 REFERÊNCIAS	44
6 CONCLUSÃO	43
5 DISCUSSÃO	35
4.6 TROPONINA I CARDÍACA	33
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)	32
4.5 DOSAGENS DAS CITOCINAS CARDÍACAS E ATIVIDADE DA ENZIMA	
4.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E HISTOLÓGICAS	31
CORPORAL (COR/MC)	30
4.3 MASSA CORPORAL E A RELAÇÃO MASSA CARDÍACA/MASSA	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esteróides Anabólicos Androgênicos (EAA)

A testosterona é o principal hormônio androgênico humano. Ela é produzida nos homens pelos testículos e nas mulheres pelos ovários e glândulas adrenais. É um derivado do colesterol, caracterizando-se assim como um hormônio esteroidal. Seus efeitos fisiológicos são divididos em dois tipos: anabólicos e androgênicos. Os efeitos androgênicos estão relacionados com o desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias. As características secundárias são mantidas durante toda a vida por um metabólito ativo da testosterona, que é a dihidrotestosterona (DHT) (KICMAN, 2008; LIPPI et al., 2011).

A molécula de testosterona tem sido frequentemente usada como modelo para modificações químicas das propriedades anabólicas e androgênicas na síntese de esteróides. De maneira geral todos os esteróides anabólicos androgênicos sintéticos possuem estrutura química baseada na estrutura da testosterona, com modificações que geralmente levam a alterações das propriedades farmacocinéticas, como aumento de tempo de meia-vida e biodisponibilidade oral, e das propriedades farmacodinâmicas, como o aumento da sua atividade anabólica (KICMAN, 2008).

Tanto a testosterona quanto os EAA exercem seus efeitos fisiológicos por meio de vários mecanismos diferentes. Esses mecanismos incluem interação com receptores específicos intracelulares pertencentes à superfamília de receptores nucleares, denominado de mecanismo genômico, interação com receptores de glicocorticóides e ações não genômicas (CATO, NESTL e MINK, 2002, HEINLEIN e CHANG, 2002; KICMAN, 2008; LIPPI et al., 2011).

O mecanismo genômico envolve ligação e ativação de receptores de andrógenos pelos anabolizantes. Esses receptores são compostos por um domínio ligante de DNA e dois domínios de ativação transcricional. Após a ligação dos andrógenos a seus receptores, que ficam situados no citosol celular, ocorre a formação do complexo fármaco/receptor ou hormônio/receptor e a migração dessas unidades

ativas para o núcleo da célula onde promovem ativação de genes e transcrição de RNAm, que são responsáveis por alterações no funcionamento das células em questão, levando, por exemplo, ao aumento da síntese protéica e crescimento celular (KICMAN, 2008; LIPPI et al., 2011).

O mecanismo não genômico envolve várias vias de ação dos anabolizantes que não estão necessariamente relacionadas com a ativação dos receptores citoplasmáticos androgênicos, geralmente com início de ação mais rápido quando comparado com o mecanismo genômico, tendo a ação da testosterona e dos esteróides sintéticos manifestada em segundos ou poucos minutos e, além disso, este efeito se diferencia do mecanismo clássico da regulação da expressão de genes observado no mecanismo genômico (CATO, NESTL e MINK, 2002).

Uma possibilidade para os efeitos não clássicos mediados pelos EAA é a ativação de receptores acoplados a proteínas G que são capazes de ativar várias vias de transdução de sinais intracelulares (CATO, NESTL e MINK, 2002). Existem evidências de que por meio dessas vias não clássicas com a participação da proteína G os EAA podem ativar cascatas de produção de segundos mensageiros tais como a de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc) por meio de ativação da enzima Adenilato Ciclase, culminando com a produção da Proteína Kinase A (PKA) e ativação dos receptores androgênicos citoplasmáticos e aumentar o cálcio livre intracelular. A elevação do cálcio intracelular ativa cascatas de sinais de transdução incluindo Proteína Kinase C (PKC), PKA e a MAPK e podem modular a atividade de fatores de transcrição. Essa última ação levaria a alterações fisiológicas da célula sem a participação dos receptores androgênicos intracelulares (CATO, NESTL e MINK, 2002; HEINLEIN e CHANG, 2002; LOSEL et al., 2003).

Além desses mecanismos é possível obsevar que os EAA podem também antagonizar os receptores de glicocorticóides. Entre as várias ações dos glicocorticóides, destaca-se a sua atividade catabólica sobre as proteínas intracelulares. Os EAA podem se ligar a esses receptores e antagonizar a ação catabólica do cortisol reduzindo a degradação de proteínas e aumentando assim a fixação de nitrogênio (KICMAN, 2008).

Os EAA foram usados com fins terapêuticos pela primeira vez em meados de 1950, desde então a sua utilização vem aumentando, principalmente entre atletas e jovens que fazem uso destas drogas de maneira abusiva (EVANS, 2004). Estudo realizado em uma faculdade Britânica observou a utilização de maneira abusiva de EAA por jovens e adolescentes, com maior incidência nos meninos em relação às meninas (4,4% x 1%, respectivamente). No estudo de Evans (2004), ainda foi constatado que o primeiro uso acontecia aos 15 anos ou menos, principalmente em frequentadores assíduos de academias de ginástica, geralmente motivados também pelo aumento da massa muscular e o desenvolvimento de corpo escultural promovido pelos anabolizantes (WILLIAMSON, 1993). No Brasil, levantamentos realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em 2001 e 2005, revelaram que o uso destas substâncias triplicou, passando de 0,3% em 2001 para 0,9% em 2005. Isto significa número superior a 1,2 milhão de pessoas que declararam fazer uso ou ter usado EAA, de acordo com os dados do CEBRID, obtidos em 108 cidades brasileiras com população superior a 200 mil habitantes (CARLINI, 2005).

Embora possuam aplicações clínicas importantes, os EAA estão relacionados com uma série de efeitos adversos, tanto em atletas, que fazem uso para melhorar seu desempenho nos esportes, quanto em não atletas que fazem uso recreacional na busca de um corpo perfeito (EVANS, 1997; PARKINSON e EVANS, 2006).

Dentre os efeitos adversos relacionados ao uso de EAA podemos citar o aumento da irritabilidade associado ao um comportamento agressivo (LISE et al., 1999), os efeitos citotóxicos e carcinogênicos (HANNA et al., 2008), porém, os principais efeitos colaterais produzidos pelos EAA encontrados na literatura, são aqueles observados no sistema cardiovascular como, por exemplo, modificações nos níveis das lipoproteínas plasmáticas, aumentando as concentrações das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e reduzindo as lipoproteínas de alta densidade (HDL), associados a distúrbios da coagulação, podendo levar ao aparecimento de doenças ateroscleróticas (LIU et al., 2003; FONTANA et al., 2008), alterações na eletrofisiologia cardíaca podendo induzir o desenvolvimento de arritmias cardíacas

(SILLIVAN, MARTINEZ e GALLAGHER, 1999; MEDEI et al., 2010), e de hipertrofia cardíaca (ANDRADE et al., 2008; HASSAN et al., 2009) que está relacionado com o desenvolvimento de prejuízo nos mecanismos reflexos que fazem o controle da pressão arterial, como o reflexo Bezold Jarisch (RBJ), podendo assim, ocasionar o desenvolvimento de hipertensão arterial (CUNHA et al. 2005; BISSOLI et al., 2009, UGGERE DE ANDRADE et al., 2011).

1.2 EAA e Controle Reflexo da Pressão Arterial

O controle da pressão arterial (PA) é feito por diferentes mecanismos reflexos, como o barorreflexo, os reflexos cardiopulmonares e o quimiorreflexo, que em conjunto são responsáveis pela regulação rápida da pressão arterial e, disfunções nesses reflexos estão relacionadas ao aumento dos níveis pressóricos e desenvolvimento de hipertensão (CABRAL et al., 1997; VASQUEZ et al., 1998).

O Reflexo Bezold-Jarisch é um reflexo cardiopulmonar ativado quimicamente por substâncias como bradicinina, serotonina e prostaglandinas. Os receptores do RBJ encontram-se principalmente concentrados no ventrículo esquerdo. Quando estes receptores são ativados promovem diminuição na atividade simpática e incremento na parassimpática, gerando hipotensão e bradicardia, promovendo assim a proteção do miocárdio em situações isquêmicas, que podem levar ao infarto agudo do miocárdio e morte súbita (MARK, 1983; AVIADO e AVIADO, 2001).

O Estudo de Andrade et. al. (2008), demonstrou que ratos tratados com Decanoato de Nandrolona (DN) na dose de 10mg/Kg/Semana, num período de quatro semanas, não provocou prejuízo na atividade do RBJ. Porém Bissoli et al. (2009) utilizando a mesma dose do estudo anterior, mas com tratamento mais prolongado (oito semanas), demonstrou prejuízos na atividade do RBJ. Tanto o trabalho com tratamento de DN por 4 semanas (ANDRADE et al., 2008), quanto os estudos com tratamento por 8 semanas (BISSOLI et al., 2009), demonstraram um aumento significativo na relação entre massa ventricular esquerda e massa corporal e uma redução dos números de núcleos de miócitos por campo microscópico, indicando a

presença de hipertrofia cardíaca. Embora o estudo de Andrade et al. (2008) tenha observado hipertrofia cardíaca com início de processo de remodelamento ventricular esquerdo e deposição de colágeno na matriz extracelular, não observou desenvolvimento de prejuízos na atividade do RBJ, provavelmente porque com um tratamento de 4 semanas com a dose de 10mg/Kg/semana, as anormalidades morfológicas induzidas pelo EAA no coração não foram suficientes para causar prejuízos nos receptores cardiopulmonares. No estudo de Uggere et al. (2008) observa-se também que os animais tratados com o anabolizante apresentam bradicardia basal. Esse é um fato que pode colaborar para não se observar prejuízos na atividade do RBJ nos ratos tratados. O estudo de El-Mas et al. (2001) demonstra que a castração de ratos machos atenua a resposta do barorreflexo sobre a bradicardia e a reposição de testosterona é capaz de restaurar essa resposta. A modulação da testosterona sobre a atividade barorreflexa provavelmente esteja envolvida com o aumento da atividade vagal eferente cardíaca, o que pode contribuir para que não ocorra prejuízo na atividade do RBJ, mesmo com a presença de hipertrofia cardíaca, como foi demonstrado por Uggere et al. (2008).

Vários outros estudos também demonstraram o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em animais submetidos ao tratamento com EAA (URHAUSEN, HOPLES, KINDERMANN, 1989; TRIFUNOVIC et al., 1995; URHAUSEN, ALBERTS, KINDERMANN, 2004; BEUTEL, BERGAMASCHI, CAMPOS, 2005; TOIT et al., 2005; PEREIRA-JUNIOR et al., 2006; FERMO et al., 2008). A hipertrofia cardíaca tem sido negativamente relacionada com os reflexos cardiopulmonares (GRASSI et al., 1988; GIANNATTASIO et al., 1990; VEELKEN et al., 1994; MEYRELLES et al., 1998; THOMAS, HEAD, WOODS, 1998; UGGERE et al., 2000; BISSOLI et al., 2009). Portanto, é possível que o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em animais tratados com DN possa acarretar redução da sensibilidade do RBJ, sendo, ainda, que o tempo de tratamento parece fundamental para o aparecimento do prejuízo desse reflexo.

1.3 EAA e Marcadores de Lesão Cardíaca

Em situações de injúria do miocárdio, a dosagem de alguns biomarcadores pode ser fundamental para avaliar os riscos dos problemas que estão afetando o coração. Um marcador importante de injúrias cardíacas é a enzima Creatina-Kinase – MB (CK-MB), que se encontra com suas concentrações séricas elevadas quando são observadas lesões cardíacas como em casos de isquemia. As dosagens dos níveis séricos de CK-MB são utilizadas clinicamente para auxiliar o diagnóstico de desordens cardíacas (BRANCACCIO et al., 2006).

Embora a CK-MB seja um marcador usado na clínica, no auxílio de diagnósticos de injúria cardíaca, ela possui baixa especificidade, por isso, alguns dos marcadores cardíacos mais precisos e mais utilizados na atualidade para diagnosticar vários tipos de doenças cardíacas, como infarto agudo do miocárdio (IAM), são as troponinas cardíacas (MORROW et al., 2007). Elas são proteínas estruturais encontradas nos miócitos cardíacos com a função de controlar a interação entre o íon cálcio e as moléculas de actina e miosina. As troponinas cardíacas constituem um complexo de proteínas com três isoformas, que são as troponinas C, I e T. A troponina C não é encontrada exclusivamente nas células estriadas cardíacas, podendo ser observada também no músculo esquelético, enquanto as troponinas T e I apresentam uma sequência de aminoácidos presente apenas nos miócitos cardíacos, e por isso constituem um marcador altamente específico para problemas cardíacos quando suas concentrações plasmáticas se encontram elevadas (DAUBERT, JEREMIAS, 2010; TWERENBOLD et al., 2011). Poucos estudos avaliam o a influência dos EAAs e troponina. Fontana et al. (2008) demonstrou que tratamento com EAA aumenta os níveis circulantes de troponina I em camundongos. Fontana, K.; Oliveira, H.C.; Leonardo, M.B.; Mandarim-de-Lacerda, C.A.; da Cruz-Höfling, M.A. Adverse effect of the anabolic-androgenic steroid mesterolone on cardiac remodeling and lipoprotein profile is attenuated by aerobicz exercise training. Int J Exp Pathol 2008;89(5):358-66.

1.4 EAA e Citocinas

Alguns estudos levantaram a hipótese que o DN em doses elevadas é capaz de estimular a produção de várias substâncias que podem exercer efeito negativo sobre

o coração. Dentre essas substâncias estão os radicais livres e algumas citocinas como o Interferon gama e o Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (LIN et al., 2011). As citocinas são produzidas principalmente pelos leucócitos e exercem seus efeitos também por meio dessas células, entretanto, células endoteliais e musculares lisas também podem expressar várias citocinas e/ou seus respectivos receptores (VON DER THUSEN et al., 2003). O estudo de Xiao et al. (2008) demonstra que os miócitos cardíacos também podem expressar citocinas por meio de produção autócrina. De acordo com seu estudo corações de ratos infartados expressam uma maior quantidade de RNAm para TNF-α e também da própria proteína. Além disso, o estudo comprova que essa expressão de TNF-α em decorrência do infarto, está relacionada a complicações graves como arritmias cardíacas.

Uma das formas de classificar as citocinas é de acordo com seu modo de ação, ou seja, algumas exercem efeitos inflamatórios e por isso são denominadas de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas pode-se citar o TNF-α, as interleucinas 12 (IL-12), IL-18 e IL-6 e o interferon gama. Enquanto outras podem exercer propriedades anti-inflamatórias, e por isso recebem essa denominação. Dentre essas são encontradas a IL-4, IL-10 e IL-13 (VON DER THUSEN et al.,2003).

O estudo de Wang et al. (2005) demonstrou que corações isolados de ratos machos castrados e/ou tratados com flutamida, um bloqueador dos receptores de testosterona, após serem submetidos ao processo de isquemia/reperfusão, apresentam uma menor concentração de várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α e IL-6, quando esses animais são comparados ao grupo controle. Tanto o TNF- α quanto a IL-6 estão relacionadas com o aumento de incidência de disfunção cardíaca em roedores e humanos (MEADOR et al, 2007; XIAO et al. 2008).

Além disso, pode-se afirmar que a produção de TNF-α no coração também está relacionada com outros estímulos, como por exemplo, isquemia, que possivelmente está associada com "up-regulation" dos genes responsáveis pela produção do TNF-α (KAUR et al., 2009). Infartos em ratos tem demonstrado aumento da expressão do RNAm de TNF-α em 1 a 4 semanas após a lesão (KAUR et al., 2009).

Além do TNF-α, vários estudos mostram que a IL-6 também está relacionada com injúria cardíaca (YANG et al., 2004; WANG et al., 2005; MEADOR et al., 2007). Yang et al. (2004) fizeram uma correlação entre a produção de IL-6 pelos cardiomiócitos e hormônios sexuais masculinos e femininos. De acordo com esse estudo, ratos submetidos a choque hemorrágico traumático, que mimetiza uma situação de hipóxia cardíaca, apresentam um aumento na expressão gênica e da concentração de IL-6. Além disso, é observada nesses animais uma disfunção cardíaca que envolve redução da fração de ejeção, aumento da resistência vascular, e disfunção ventricular esquerda, numa avaliação feita duas horas após o choque. Seu estudo mostra ainda que quando os animais são previamente castrados, reduzindo os níveis de testosterona e DHT ou tratados com estrógenos, que também resulta numa redução da produção dos hormônios masculinos, ocorre uma redução na concentração de IL-6 nos cardiomiócitos e no prejuízo da função cardíaca, nos parâmetros citados acima. Seu trabalho sugere que a depressão da função cardíaca pode ser devido a "up-regulation" da produção de IL-6 por cardiomiócitos em condições de choque hemorrágico e que o tratamento com hormônios sexuais femininos ou a castração estão envolvidos na preservação da função cardíaca, provavelmente por promover "down-regulation" da IL- 6 nos miócitos.

Diferentemente do TNF-α e da IL-6, a interleucina 10 (IL-10) apresenta propriedades anti-inflamatórias que contrabalançam o efeito pró-inflamatório daquelas citocinas. A IL-10 é uma citocina imunorregulatória que é secretada por uma ampla variedade de células incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos. Uma de suas funções é a de atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Ao contrário do IL-6, ela diminui a expressão nas células endoteliais das moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM -1), molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) e reduz a atividade das metaloproteinases da matriz extracelular (MPP), que por sua vez é induzida pelo TNF-α (VON DER THUSEN et al., 2003).

Na insuficiência cardíaca (IC) é obervado um desequilíbrio entre as concentrações de TNF-α e da IL-10, no qual o primeiro está em maior quantidade que o segundo, e esse desequilíbrio está relacionado com a remodelagem cardíaca, uma evolução

negativa da doença e uma piora do prognóstico do paciente (ZANG et al., 2007). O trabalho de Meador et al. (2007) mostra que camundongos com deficiência de IL-10, apresentam maiores níveis tanto de RNAm para IL-6 quanto da citocina quando estimulados com LPS, mostrando um aumento transcricional dessa proteína na ausência da IL-10. Essas alterações foram observadas nos músculos cardíaco e esquelético e podem estar relacionadas com a idade, ou seja, quanto mais velho o animal, maior será é a concentração de IL-6.

1.5 EAA e Sistema Renina Angiotensina (SRA)

A atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) está elevada em animais tratados com doses suprafisiológicas de DN (DO CARMO et al., 2011). A ECA é a enzima responsável em converter a Angiotensina I (ANG I) em Angiotensina II (ANG II). A ANG II é um oligopeptídeo que tem ações vasoconstritoras e eleva a pressão arterial. Sua produção intracardíaca apresenta-se elevada em corações insuficientes e que apresentam fibrose devido à deposição de colágeno. Provavelmente essas ações são mediadas por receptores AT1, pois o bloqueio desses receptores com fármacos seletivos como Losartan é capaz de reduzir o remodelamento cardíaco produzido pela ANGIO II (LEASK, 2010). Além disso, a superexpressão do sistema renina angiotensina (SRA) está relacionado com aterosclerose, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva e infarto do miocárdio, além de doenças vasculares cerebrais (FERRARIO e STRAWN, 2006).

Alguns estudos demonstram que as ações deletérias da ANG II sobre o sistema cardiovascular, como indução de fibrose cardíaca, hipertensão arterial e efeito proliferativo celular, estão relacionadas com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF-α e TGF-β (FERRARIO e STRAWN, 2006, ANDRZEJCZAK, GÓRSKA e CZARNECKA, 2007, LEASK, 2010; DO CARMO et al., 2011). A ANG II desenvolve papel chave na regulação da resposta inflamatória vascular, bem como complicações futuras, por ativar o recrutamento de células inflamatórias para o local das injúrias arteriais. Ela também regula a expressão de

moléculas de adesão nos vasos sanguíneos, quimiocinas e citocinas. (FERRARIO e STRAWN, 2006).

Diante do exposto e baseado nos estudos anteriores do nosso grupo, levantamos a questão: Quais seriam os possíveis prejuízos para o sistema cardiovascular em ratos wistar tratados com dose DN de 20mg/Kg durante um período de 4 semanas? Podemos hipotetizar que uma dose maior do que a usada anteriormente de DN (10mg/kg) poderá ampliar o prejuízo do RBJ. Além disso, é possível encontrar injúria cardíaca, devido a relação existente entre o anabolizante, citocinas pró-inflamatórias e SRA. A elucidação dos efeitos deletérios do DN sobre o sistema cardiovascular na dose e tempo propostos nesse estudo, poderá ter implicações importantes na demonstração dos riscos que o consumo abusivo de anabolizantes pode significar para os seus usuários.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos deletérios do esteróide anabolizante Decanoato de Nandrolona (DN), na dose suprafisiológica de 20mg/Kg/semana, sobre o sistema cardiovascular, em ratos *Wistar* Kyoto sedentários.

2.2 OJETIVOS ESPECIFÍCOS

- 2.2.1. Verificar os efeitos do DN sobre os parâmetros hemodinâmicos pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).
- 2.2.2. Investigar o efeito do tratamento crônico de DN na dose supracitada, sobre função do reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch.
- 2.2.3. Avaliar os efeitos deletérios do anabolizante sobre o músculo cardíaco por meio das dosagens de substância que, quando alteradas, podem indicar a presença de injúria cardíaca, como a Troponina I.
- 2.2.4. Investigar a consequência do uso DN cronicamente sobre a atividade inflamatória cardíaca, por meio da dosagem no tecido cardíaco de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6, e anti-inflamatória IL-10.
- 2.2.5. Avaliar a presença ou não de hipertrofia cardíaca no coração dos ratos submetidos ao tratamento com DN e os efeitos negativos que isso representa para o coração dos animais.
- 2.2.6. Verificar a presença de remodelagem cardíaca por meio de análises histológicas, para observar se há depósito de colágeno na matriz extracelular dos miócitos cardíacos.

2.2.7. Investigar a participação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) por meio da analise da atividade da ECA, em decorrência do tratamento com DN, e sua consequência para o sistema cardiovascular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

As investigações foram conduzidas de acordo com o guia de pesquisas biomédicas para o cuidado e uso de animais laboratoriais, e foi aprovado pelo comitê de ética de animais da Universidade Vila Velha (UVV), Espírito Santo, Brasil (nº 68/ 2009).

Foram utilizados ratos *Wistar Kyoto* (*Rattus novergicus albinus*), machos com 3 meses e peso corporal variando entre 250 – 350g. Os animais foram colocados em gaiolas individuais com acesso a água e ração *ad libitum* e mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h) e temperatura de 20 – 25°C. Foram divididos em dois grupos: a) controle (CONT) (n=8): animais sedentários tratados com o veículo (óleo de amendoim com álcool benzílico, 90:10 v/v), b) DECA (n=8): animais sedentários tratados com DN. As doses aplicadas nos animais foram de 20 mg.Kg⁻¹.semana⁻¹ divididas em duas aplicações intra-musculares. Tanto veículo quanto DN foram aplicados no músculo femoral dos animais por 4 semanas, sob forma de rodízio, ou seja, uma aplicação realizada no músculo femoral esquerdo e a seguinte no direito e assim sucessivamente.

3.2 Análise hemodinâmica

Após o fim do tratamento dos animais, os mesmos foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol, Cristália, Brasil; 50mg/Kg, i.p.). O catéter arterial femoral foi conectado a transdutores de pressão (spectramed – Statham, P23XL, USA) este estava ligado a um sistema computadorizado (Pentium MMX 233 MHZ) e um programa para aquisição de dados biológicos (BIOPAC – BIOPAC System, Inc., Santa Bárbara, Califórnia, USA, mod. MP 100^A / serie 94111065). Os valores de pressão arterial média (PAM), e FC foram aferidos através de um catéter implantado na artéria femoral, 24horas após a cateterização. A verificação da PA e da FC foram feitas com os animais acordados, portanto sem influência do anestésico e feito sempre pela manhã.

3.3 Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ)

O reflexo foi ativado quimicamente pela injeção intravenosa *in bolus* de 5 doses randomizadas de serotonina (5-HT; sigma; 2-32 µg/Kg de peso corporal). O reflexo foi identificado por reduções dose-dependentes na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial diastólica (PAD), e avaliado por meio do valor relativo máximo de queda de FC e PAD após cada dose de 5-HT (BISSOLI et al., 2000; UGGERE et al., 2000; ANDRADE et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; BISSOLI et al., 2009).

3.4 Estimativa da hipertrofia cardíaca e Determinação da massa corporal final

Após o fim do experimento os animais foram eutanasiados com dose elevada de pentobarbital sódico e a massa total do coração foi medida. A estimativa da hipertrofia cardíaca foi feita por meio da relação massa cardíaca / massa corporal (mg/g) (BISSOLI et al., 2000; UGGERE et al., 2000; ANDRADE et al., 2007; ANDRADE et al., 2008; BISSOLI et al., 2009).

A determinação da massa corporal final (MCF) foi feita no dia do experimento. A comparação da massa inicial (MI) com a massa final (MF) dos animais permitiu a determinação da variação da massa (Delta) e o percentual de ganho de massa dos animais.

3.5 Análises Morfométricas e Histológicas

Após a eutanásia, os corações foram retirados para que fosse estimada a hipertrofia cardíaca. Após esse procedimento, o ventrículo esquerdo (VE) de cada coração foi acondicionado em solução formol neutra a 10% tamponada, por um período de 24 horas. Após a clivagem do coração os fragmentos foram incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo (Leica® RM 2125RT; Nussloch, Germany), com cinco micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram estendidos em lâminas de vidro e corados pelo método de Hematoxilina-

Eosina (H&E) e Picrossírius, para a avaliação morfométrica dos miócitos cardíacos, hipertrofia celular e da deposição de colágeno do tipo I no interstício (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES, 1996), sob polarização, respectivamente.

A avaliação histológica foi realizada por patologista, sem conhecimento prévio da divisão dos grupos, em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) acoplado ao sistema de aquisição e análise histológica (MOTICOM 2000; MOTIC INSTRUMENTS INC., Canadá). A análise morfométrica foi realizada pela contagem do número do núcleo de miócitos por campo e pela medida da área do núcleo do miócito, sob um aumento de 400X (ANDRADE et al., 2008 e 2011; AKAR et al., 2004, TAKAHASHI, TATSUGI e KOHNO, 2004; TANNO et al., 2011).

3.6 Avaliação da atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A atividade de ECA foi determinada pela dosagem do dipeptídeo Gly-Gly que é o produto da clivagem do tripeptídeo sintético hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly) por essa enzima, como descrito previamente por Serra et al. (2005). Uma alíquota de 1,0 g de coração de rato foi adicionada em tubos de centrífuga contendo 5,0 ml de tampão fosfato, pH 8,3 (50mM) e homogeneizado. A mistura foi então centrifugada a 3.000g por 40minutos a temperatura ambiente. Para a reação enzimática, uma alíquota do sobrenadante de coloração vermelho claro (concentração final 100 mg/ml), ou do controle positivo, solução de pulmão de coelho (concentração final 9,1 mg/ml, Sigma, USA), foi misturado com tampão do ensaio e com a solução do substrato composto pelo tripeptídeo Hip-Gly-Gly (100 mM; Sigma, USA). Após a homogeneização a mistura foi incubada por 35 minutos a 37°C. A reação foi interrompida através da adição de tungstato de sódio (300 mM) e ácido sulfúrico (0,33 mM). Foi então misturado ao sistema o reagente colorimétrico TNBS (Sigma, USA) e deixado em repouso na ausência de luminosidade por 20 minutos. Após esse período foi feita a leitura da absorbância da placa em um leitor de microplacas de titulação (TP-Reader, Thermoplate) a 420 nm contra o branco de reagente. O branco de reagente foi preparado de igual maneira, porém a solução de tungstato de sódio e ácido sulfúrico foi adicionada antes da solução enzimática. O ensaio foi realizado na presença de 10µl de solução de captopril (concentração final 64 nM) além de ser realizado em triplicata. A atividade da ECA foi calculada pela seguinte equação: **% atividade = (A x 100)]/ B,** na qual **A** é a medida da absorbância em 420 nm do coração do rato e **B** é a absorbância da solução do pulmão de coelho.

3.7 Dosagem das citocinas inflamatórias cardíacas e atividade da ECA

As concentrações teciduais de IL-6, TNF-α e IL-10 foram realizadas em amostras de tecido cardíaco (50mg) por imunoensaio enzimático (ELISA; TP-Reader, Thermoplate), utilizando Kits comerciais (Invitrogen, San Jose, USA), de acordo com instruções do fabricante. Os valores das citocinas foram corrigidos por conteúdo protéico e expressos em picogramas por miligramas de proteínas (MEADOR et al., 2008).

3.8 Análise por Western blot da Troponina I Cardíaca

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) proporcionará uma migração de proteínas dependente apenas de seu peso molecular, haja vista a presença de SDS, detergente carregado negativamente que se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas. Assim, surgem longas cadeias polipeptídicas com a neutralização da carga intrínseca das proteínas. A utilização de β-mercaptoetanol, um agente redutor, rompe as ligações dissulfeto dessas cadeias permitindo assim que as subunidades protéicas sejam analisadas independentemente.

As concentrações de proteína total nas amostras do coração foram determinadas usando o ensaio de proteína de Bradford, e as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de lise (tampão Laemmli: 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% glicerol, 2% SDS, 0.02% azul de bromofenol contendo 5% de ß-mercaptoetanol-aquecido a 100° C em banho-maria por 4 minutos), tal como descrito previamente por Boehm et al. (2004). As proteínas foram separadas utilizando eletroforese em

gel de sódio-poliacrilamida dodecil sulfato, transferidas para membranas Immobilon polyvinyldifluoride e em seguida coradas com uma solução de Ponceau S (Sigma, EUA). As manchas foram bloqueadas com tampão de lavagem contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20 durante 1 h à temperatura ambiente. Eles foram tratadas com o anticorpo monoclonal de camudongo contra troponina I (1:1500, Abcam, EUA) durante 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens, os blots foram subsequentemente incubadas com anticorpo policlonal de cabra secundário conjugado com peroxidase de rato (1:10000, 1:1500, Abcam, EUA) durante 1h à temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por coloração com diaminobenzidina (Sigma, EUA) e chloronaphthol (Sigma, EUA). A intensidade do sinal da troponina I cardíaca foi determinada com ImageJ Software (ABRAMOFF et al., 2004; RASBAND et al., 2007). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β-actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nos níveis das proteínas.

3.9 Análise Estatística

Teste-t independente do Student's foi usado para análise dos dados da PAM basal e da FC, a relação Massa corporal / Massa cardíaca (índice de hipertrofia cardíaca), massa corporal, número de miócitos por campo microscópico, a área do núcleo dos miócitos, as concentrações de citocinas cardíacas, troponina I e da atividade da ECA. Os dados das alterações da PAD e da FC produzidos pela 5-HT foram analisados usando ANOVA de duas vias com teste de Fisher para múltiplas comparações. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M). A significância estatística foi definida como p < 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros Hemodinâmicos

Após o tratamento dos animais por 4 semanas com DN pode-se notar um incremento na PAM do grupo DECA em relação ao controle (CONT: 99±2 mmHg vs DECA: 148±7 mmHg; p<0,01;), porém FC não foi diferente entre os grupos CONT e DECA (CONT: 389±8 bpm vs 391±13 bpm), como pode ser observado na figura 1.

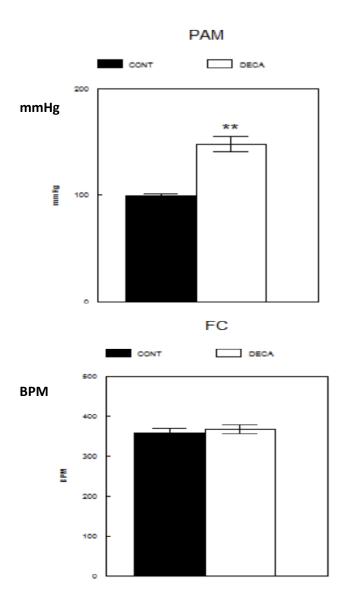


Figura 1: Valor da PAM (mm Hg) e da FC (BPM) nos animais controle (CONT) e tratados com DN (DECA, 20 mg.Kg⁻¹.semana⁻¹). Os valores representam a média ± E.P.M.; ** p<0,01 comparado ao controle.

4.2 Reflexo Bezold - Jarisch (RBJ)

Após a administração *in bolus* de doses crescentes de Serotonina (5-HT), foi avaliada a diferença do percentual de queda de PAD e FC entre os grupos. Pode-se observar uma diferença entre os grupos CONT e DECA tanto na queda da PAD quanto na FC. Os animais DECA apresentaram menor queda da FC e PAD quando comparados aos valores dos animais CONT, demonstrando prejuízo no RBJ no grupo DECA (Figura 2).

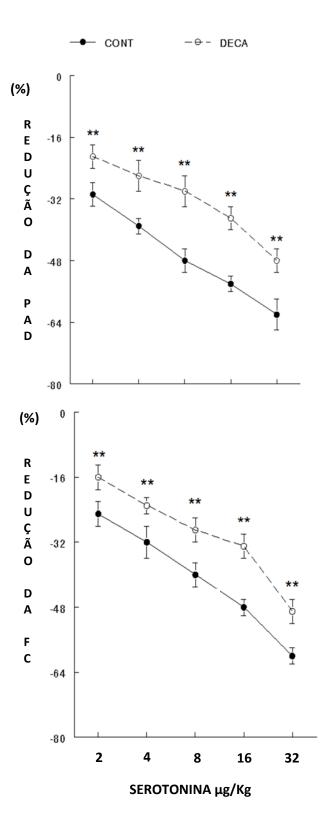


Figura 2: Avaliação da atividade do RBJ por meio do percentual de queda da PAD e da FC; entre os animais controle (CONT) e tratados com DN (DECA), após a administração de doses crescentes de 5-HT (2-32 μg/Kg). Os valores foram expressos como média ± E.P.M.; **p<0,01 em relação ao grupo CONT.

4.3 Massa corporal e a relação massa cardíaca / massa corporal (COR/MC)

Tratamento com DN reduziu a massa corporal final dos animais tratados com DECA comparado com o grupo controle (tabela 1). Essa redução foi observada também nos valores percentuais (%) e na variação das médias das massas corporais, representado pelo Delta.

Tabela 1: Massa corporal inicial e final dos animais tratados com DECA.

	Inicial(g)	Final(g)	Delta	%
CONT	244±17	311±16	67±12	28±6
DECA	246±11	274±15*	20±8**	8±3**

Valores representam a media ± EPM; *p<0,05 e ** p<0,01 comparado com o grupo controle.

DN também elevou a relação COR/MC dos animais tratados comparados aos animais controles (CONT: 3,13±0,07 mg/g; DECA: 3,79±0,12 mg/g; p<0,01). Indicando assim o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca nos animais que utilizaram o anabolizante (Figura 3).

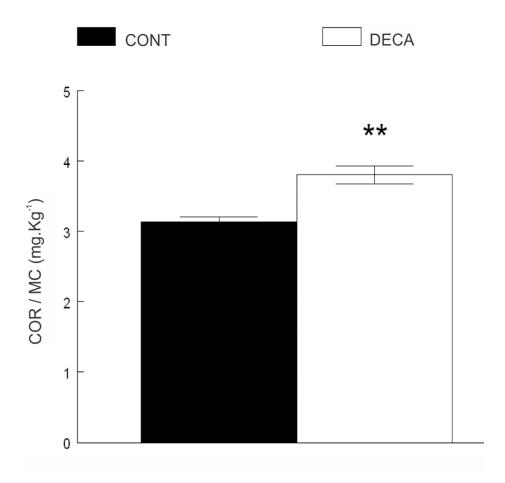


Figura 3. Avaliação da hipertrofia cardíaca por meio da relação COR/MC nos animais do grupo DECA e CONT. O grupo DECA apresentou uma maior relação que o grupo CONT, indicando hipertrofia cardíaca. Os valores foram expressos como média ± E.P.M; **p<0,01 em relação ao grupo CONT.

4.4 Analises Morfométricas e Histológicas

A figura 4 mostra as análises histológicas do coração dos grupos CONT e DECA. Observa-se que o tratamento com DN produziu redução no número de núcleos dos miócitos por campo observado (CONT: $747.5 \pm 25 \ \mu\text{m}^2 \ v\text{s}$ DECA: $917.1 \pm 40 \ \mu\text{m}^2$; p < 0.01; Figure 4G). DN também provocou um aumento na área dos núcleos dos miócitos cardíacos comparado com o grupo controle (CONT: $747.5 \pm 25 \ \mu\text{m}^2 \ v\text{s}$ DECA: $917.1 \pm 40 \ \mu\text{m}^2$; p < 0.01; Figura 4H). Além disso, DN aumentou o depósito de colágeno tipo I nos animais tratados (CONT: $86.9 \pm 02 \ \text{mm}^2$, DECA vs $864.1 \pm 43 \ \text{mm}^2$; p < 0.01; Figure 4I).

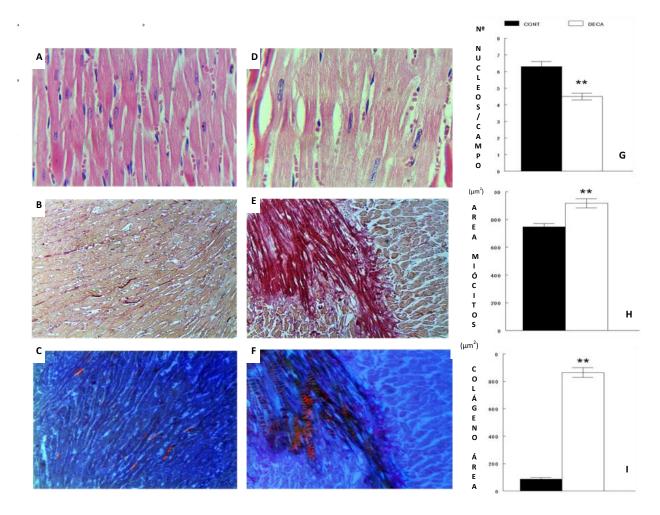


Figura 4. Análise Histológica do coração dos grupos CONT e DECA. Amostras coradas com o método Hematoxilina/Eosina (H&E). 400x (A: CONT; D: DECA), e com o método vermelho Picrosirius: 100x (B: CONT; E: DECA). Amostras vermelho Picrosirius também foram analisadas sob luz polarizada (C: CONT; F: DECA). Painel G mostra o gráfico de barras do número do núcleo de miócitos/campo. Painel H mostra o gráfico de barras da área dos núcleos dos miócitos. Painel I mostra a mensuração do colágeno tipo I da matrix. Análises morfométricas foram realizadas utilizando Moticam Plus 2000 software. Os valores foram expressos como média ± E.P.M; **p<0,01 em relação ao grupo CONT.

4.5 Dosagens das citocinas cardíacas e atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

De acordo com os dados representados na Figura 5 é possível perceber que as citocinas pró-inflamatória IL-6 e TNF–α encontram-se aumentadas em relação ao grupo controle. Por outro lado, a citocina IL-10, que possui atividades anti-inflamatórias encontra-se reduzida nos animais submetidos ao tratamento. A

atividade da ECA também está mais elevada no grupo DECA em relação ao grupo CONT.

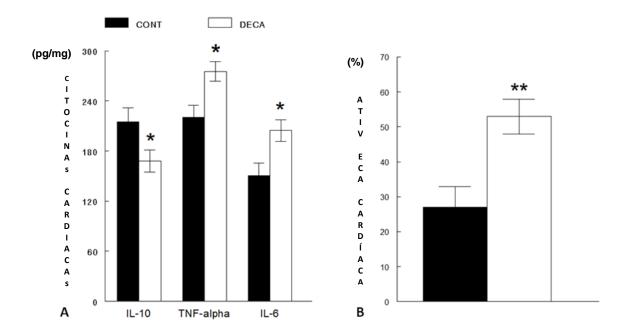


Figura 5: O Painel A mostra os efeitos do tratamento com DN na concentração tecidual de citocinas inflamatórias cardíacas. Painel B mostra que atividade da ECA estava aumentada no grupo DECA comparado com o grupo CONT. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. *p<0,05 e **p<0,01.

4.6 Troponina I Cardíaca

A figura 6 demonstra a dosagem tecidual do biomarcador Troponina I cardíaca, utilizada para avaliar injúrias cardíacas. Ela está reduzida no grupo DECA quando comparada ao grupo CONT. Observa-se nessa figura a análise feita por Western Blotting (Painel B).

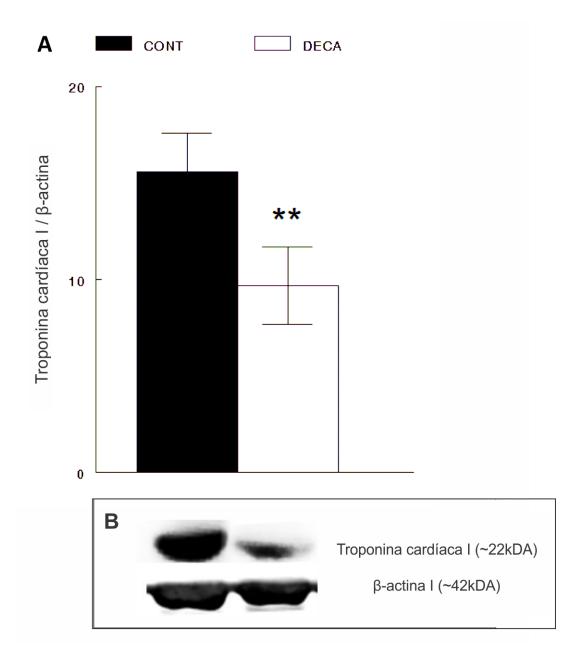


Figura 6. Efeitos do tratamento com DN no biomarcador de lesão cardíaca Troponina I e β actina. O painel A demonstra o gráfico de barras da troponina cardíaca I. O Painel B demonstra a análise das amostras por Western Blotting do grupo CONT comparado com o grupo DECA usando o software Image J. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. *p<0.05 e **p<0.01.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho é possível observar que o tratamento com DN produz uma redução na atividade do RBJ, no controle da frequência cardíaca e na pressão arterial. Essa redução no controle do RBJ está associada ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, fibrose do miocárdio, redução da citocina anti-inflamatória IL-10, aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 e TNF-α e aumento na atividade da ECA cardíaca. Nossos dados também indicam a presença de remodelamento cardíaco e subsequente injúria do miocárdio como é indicado pela redução da troponina cardíaca I. Como resultado dessas alterações, os animais tratados com DN demonstraram aumento na PA que atingiu níveis hipertensivos.

Os animais tratados com DN apresentaram níveis basais da PAM mais elevados quando comparados com o grupo controle. Os andrógenos podem modular a pressão arterial. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) intactos apresentam níveis pressóricos mais elevados quando comparados com SHR castrados. A PAM volta a subir nos animais gonadoctomizados e submetidos à reposição de testosterona (CHEN, NAFTILAN, OPARIL,1992). Nossos dados relacionados ao desenvolvimento de hipertensão arterial nos animais tratados com DN, assim como dados anteriores do laboratório (UGGERE DE ANDRADE et al., 2011), que submeteu ratos Wistar ao tratamento com DN na dose de 10mg/Kg num período de 8 semanas e obteve elevação da PAM (DN: 109±2 mmHg; CONT: 98±1 mmHg), reforçam o papel dos androgênios em elevar os níveis pressóricos em ratos.

Hipertrofia cardíaca é uma das alterações morfológicas conhecidas induzidas pelos EAA (BEUTEI et al., 2005; PELOUCHET et al., 1994; URHAUSEN et al., 1989; TRIFUNOVIC et al., 1995, UGGERE DE ANDRADE et al., 2011), mesmo em condições sedentárias (BEUTEL et al., 2005; PELOUCHET et al., 1994; ANDRADE et al., 2008). O Mecanismo pelo qual o EAA induz a hipertrofia e os prejuízos observados nas células musculares cardíacas por alguns autores (HASSAN et al., 2009; MEDEI et al., 2010), e também no nosso estudo, pode ser atribuído a receptores androgênicos, destinados a ligação com a testosterona fisiológica, presente no sistema cardiovascular, incluindo o endotélio vascular humano, células

musculares lisas, macrófagos e miócitos cardíacos. Sendo os EAA moléculas semelhantes à testosterona, podem se ligar a receptores androgênicos no miocárdio e modular diretamente a transcrição e tradução de proteínas e a função de algumas enzimas (MARSH et al., 1998), uma dessas enzimas pode ser a ECA, como demonstrado em nosso estudo.

O aumento da atividade da ECA induzida pelo DN no nosso estudo está em acordo com a literatura, igualmente a possível relação do SRA com a deposição de colágeno e a hipertrofia cardíaca (ROCHA et al., 2007; DO CARMO et al., 2011). O estudo de Rocha et al. (2007) mostra que os animais tratados com DN tiveram aumento na deposição de colágeno tipo I e III no miocárdio e que esse efeito é decorrente do aumento da atividade da ECA cardíaca e responsável pela hipertrofia cardíaca observada nesses animais. No estudo de Rocha et al. (2007) ainda é observado aumento de 60% na expressão de receptores AT1 no coração dos animais tratados em comparação ao grupo controle. Além disso, o trabalho de Do Carmo et al. (2011) mostra o aumento da produção de Aldosterona e fatores inflamatórios como TGFβ e osteopontina e a indução de fibrose cardíaca com deposição de colágeno no tecido, induzidos pelo DN. Adicionalmente, o aumento do colágeno na matriz extracelular do coração parece ser um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca que ocorre devido ao uso de DN (ROCHA et al, 2006).

Um dos mecanismos pelos quais a ANG II promove o remodelamento cardíaco é induzindo a produção de citocinas com caráter pró-inflamatórias como o TNF-α e IL-6 (discutiremos abaixo o papel das citocinas nas alterações cardíacas ocasionadas pelo DN). A inoculação de LPS em ratos SHR aumenta significativamente a produção dessas citocinas, porém, quando os animais são tratados com inibidores da ECA e antagonistas de receptores AT1, é observada a redução das mesmas. Isso demonstra que a ANG II é capaz de desencadear uma resposta inflamatória, que é extremamente prejudicial para o miocárdio, e que as drogas que reduzem ou bloqueiam a ação do SRA, apresentam papel imunomodulador ao atenuar as ações da ANG II (ANDRZEJCZAK et al., 2007).

Nossos resultados indicam que o DN prejudica o RBJ. Pode-se considerar esse prejuízo como um mecanismo dose-dependente do anabolizante, porque em estudos prévios, animais tratados com metade da dose do anabolizante e no mesmo intervalo de tempo não demonstraram nenhuma alteração na atividade do RBJ (ANDRADE et al., 2008). Nosso grupo também demonstrou previamente um efeito tempo-dependente do DN sobre o RBJ (ANDRADE et al., 2008; BISSOLI et al., 2009). Quando foi realizado tratamento por 8 semanas na dose 10mg/Kg de DN, observamos elevação na pressão arterial. Os valores não chegaram a níveis hipertensivos, mas os animais já apresentavam pequeno prejuízo na atividade RBJ (BISSOLI et al., 2009). Sendo assim, é possível entender que o aumento na dose de DN, num período menor de tempo de exposição, pode aumentar os efeitos deletérios do esteróide anabólico sobre o sistema cardiovascular.

Uggere e colaboradores (2000) demonstraram que a hipertrofia cardíaca apresentada em ratos espontaneamente hipertensos é um fator preponderante na redução da sensibilidade do RBJ e que o tratamento com Enalapril, reduz a hipertrofia e, por conseguinte melhora o reflexo. Em outro estudo do nosso grupo (ANDRADE et al., 2008), utilizando tratamento com DN de 10mg/kg por 4 semanas em ratos, foi observada uma discreta hipertrofia cardíaca, mostrada por meio da análise histológica, entretanto a atividade do RBJ não estava alterada. Bissoli et al. (2009) posteriormente, utilizando tratamento mais prolongado com DN (8 semanas) observou hipertrofia cardíaca e prejuízo na sensibilidade do RBJ. Dando continuidade aos estudos com DN, nosso grupo demonstrou que existe uma íntima relação entre o tratamento com o anabolizante, prejuízo no RBJ e o SRA. Para isso os animais receberam DN e Enalapril concomitantemente. Nos animais DN e tratados com enalapril a resposta do RBJ não foi alterada, ou seja, a inibição da ECA é capaz de prevenir o prejuízo no RBJ provocados pelo anabolizante (UGGERE DE ANDRADE et al., 2011). Essa melhora na resposta do RBJ nos animais submetidos a tratamento com DN é devido provavelmente às melhoras nos parâmetros cardiovasculares, como a prevenção da hipertrofia cardíaca, produzida pelo Enalapril, ao reduzir a atividade SRA.

Várias citocinas tem sido relacionadas com remodelamento e injúria cardíaca (WEI et al., 2001; DO CARMO et al., 2011). Wei et al. (2001) observou que a intensidade da injúria do miocárdio está relacionada com a liberação de citocinas, desta forma foi de nosso interesse investigarmos o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nossos resultados demonstram que dose alta de DN foi capaz de elevar as concentrações teciduais ventriculares de TNF-α e IL-6 e reduzir de IL-10. O estudo de Du Toit e colaboradores (2005), utilizando o anabolizante Laurato de Nandrolona, realizou dosagens de TNF-α diretamente no tecido cardíaco e demonstrou maior concentração no grupo tratado do que no grupo controle. Meador et al. (2007) observou um alto conteúdo de citocinas pró-inflamatórias, como o IL-6 e TNF-α, induzido pela administração de LPS em camundongos knockout para IL-10, que ao contrário das anteriores apresenta propriedades anti-inflamatórias, e que quanto maior o desequilíbrio entre as concentrações de citocinas anti e pró-inflamatórias, maiores são os prejuízos para o miocárdio. Desta forma, no nosso estudo podemos inferir que os animais tratados com DN apresentam um estado pró-inflamatório, podendo acarretar consequências deletérias para o miocárdio.

O provável mecanismo para a produção de citocinas pró-inflamatórias no coração envolve a participação de uma proteína encontrada nos miócitos cardíacos denominada MAP-Kinase p38 (p38 MAPK), pois a produção tanto do TNF-α quanto da IL-1β nessas células depende da translocação do NF-kB, que pode ocorrer pela ativação da via da p38 MAPK (WANG et al., 2005). De acordo com o estudo de Wang e colaboradores (2004), os EAA como o DN, podem também elevar p38 MAPK e consequentemente promover a elevação do TNF-α, como é observado no nosso trabalho. O TNF-α seria capaz de provocar ou agravar a injúria no coração por indução de apoptose de células cardíacas após a isquemia (SHEN et al., 2006; KAUR et al., 2009). O TNF-α aumenta a expressão e a atividade da metaloproteinase da matriz extracelular (MMP-2) tempo e dose-dependente e aumenta o percentual de apoptoses das células cardíacas (SPINALE, 2002). Esses efeitos provavelmente são mediados pela MMP-2, pois a inibição dela, com fármacos ou anticorpos específicos, reduz significativamente o grau de apoptose nos miócitos cardíacos (SHEN et al., 2006).

Assim, em nosso estudo demonstramos aumento significativo no TNF-α induzido pelo DN, isso nos levaria a presumir um aumento concomitante na expressão e na atividade da MMP-2 que poderia desencadear processos apoptóticos em células cardíacas (SHEN et al., 2006), o que por sua vez, poderia explicar o remodelamento cardíaco observado no miocárdio dos animais tratados com os anabolizantes mostrados nesse estudo.

A IL-6 é apontada como uma citocina pró-aterogênica, pois estudos *in vitro* tem demonstrado um efeito de "up-regulation" sobre moléculas de adesão nas células endoteliais, ativação de macrófagos e proliferação de células musculares lisas. Dessa forma a IL-6 pode até ser usada como marcador para desenvolvimento de doenças ateroscleróticas periféricas (TZOULAKI et al., 2005; VON DER THUSEN et al., 2003). A IL-6 e seu receptor solúvel são liberados pelos macrófagos e a proteína *gp130*, que é constitutiva em muitas células, passa por um processo de "up-regulation". Após esses dois eventos, ocorre a ligação da IL-6 com seu receptor na célula, levando à ativação da *gp 130*, num processo denominado de transcinalização, que será provavelmente o responsável pelo processo de proliferação celular. A ativação da *gp 130* pela IL-6 e por todas as demais citocinas que fazem parte de sua família é o evento central para as ações dessas proteínas com caráter pró-inflamatório (VON DER THUSEN et al., 2003).

O papel da IL-6 no coração é bastante complexo. Ela está relacionada com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca como demonstrado no estudo de Hirota e colaboradores (1995), que utilizou camundongos transgênicos, dentre os quais havia um grupo que não possuía os genes nem para IL-6 nem seu receptor e outro que tinha superexpressão de ambos. Nesse último grupo é observado hipertrofia das células do miocárdio que ocorre provavelmente devido à ativação da proteína sinalizadora *gp*130, decorrente da ação da IL-6 em seus receptores presentes nos miócitos cardíacos. Sendo assim, além dos prováveis mecanismos explicados anteriormente, que podem ser responsáveis pelo aumento da massa cardíaca em relação à massa corporal observado nos animais tratados, o aumento da IL-6 provocado pelo anabolizante, pode ser mais um evento que esteja envolvido nessa situação.

O trabalho de Schieffer e colaboradores (2000) demonstra que um dos mecanismos que aumenta a produção *in vitro* de IL-6 é a ligação da Angiotensina II em receptores AT1. Quanto maior for a atividade SRA, maior será a produção da IL-6. *In vivo* o estudo de Schieffer e colaboradores (2000) demonstra que em síndrome coronária aguda, na região onde se encontra a placa de ateroma, é observada a expressão elevada de IL-6, concentração abundante de macrófagos e ANG II. Além disso, é observado também que na presença de Losartan, um antagonista seletivo dos receptores AT₁, a produção de IL-6 fica significativamente reduzida. Isso nos mostra que a ANG II é um potente regulador da reação inflamatória, principalmente em lesões ateroscleróticas e que a IL-6 participa ativamente desse processo, além de demonstrar que uma via responsável pela produção da IL-6 é o SRA. No estudo atual foi verificado aumento na atividade da ECA no grupo tratado, e como essa enzima é responsável pela transformação de ANG I em ANG II, podemos especular que, provavelmente, o aumento da atividade da ECA e consequentemente de ANG II possa ser um fator envolvido no aumento da IL-6 nesses animais.

Nosso estudo demonstra que o tratamento com DN produz tanto aumento das concentrações cardíacas de TNF-α, quanto da atividade da ECA, e parece existir uma associação entre essa citocina e o SRA, assim como já foi descrito para IL-6. O estudo de Gurantz et al. (2003) demonstra que fibroblastos cardíacos de ratos em cultura de células, quando submetidos a tratamento com TNF-α, tem aumento na expressão do RNAm para o receptor AT₁ e up-regulation de receptores AT₁ nas superfícies dessas células, aumentado assim a ação da ANG II sobre os fibroblastos cardíacos. O aumento dos receptores AT1 não leva à redução de sua sensibilidade e são tempo e dose-dependentes de TNF-α. Outro estudo demonstrou que os fibroblastos estão envolvidos no processo de remodelamento cardíaco por meio do aumento de produção de proteínas da matriz extracelular como o colágeno e fibronectinas e que esses efeitos são aumentados pela ação da ANG II mediado por receptores AT₁ (LEASK, 2010). Além disso, o estudo de Carrasco et al (2010), demonstrou que vários inibidores da ECA (IECA) são capazes de reduzir as concentrações plasmáticas de TNF-α em ratos SHR, mostrando assim que essas drogas também possuem propriedades anti-inflamatórias ao reduzir citocinas próinflamatórias. Seu estudo associa a redução dessa citocina com a redução da hipertrofia ventricular observada nesses animais após o tratamento. Juntos, esses estudos demonstram uma íntima relação entre TNF-α e o SRA, no qual a citocina aumentada seria capaz de estimular a atividade da ANG II por meio do aumento de receptores AT1 na superfície de células como os fibroblastos cardíacos e o SRA estimularia a produção de TNF-α, provavelmente via NF-kB (GURANTZ et al. 2003; CARRASCO et al., 2010; LEASK, 2010).

Além de demonstrar que o DN é capaz de promover um aumento das concentrações de citocinas com caráter pró-inflamatório como o TNF-α e a IL-6, este estudo também apresenta uma redução das concentrações de IL-10. A relação IL-10/TNF-α tem sido adotada como indicador do estado inflamatório e quanto menor for essa relação, piores são os prognósticos apresentados para situações como insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio (KAUR et al., 2006). É descrito na literatura que a IL-10 é capaz de promover down regulation na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α (SCHOTTELIUS et al., 1999; KAUR et al., 2009). De acordo com o estudo de Schottelius et al. (1999) a IL-10 é capaz de reduzir a formação de TNF-α por impedir a translocação do NF-kB do citoplasma celular até o núcleo onde ocorreria a ativação dos genes para produção da citocina. Além disso, é observado nesses estudos que a deficiência na produção de IL-10 está relacionada com o aumento da expressão de TNF-α, como também foi observado nesse estudo, e uma exacerbação de seus efeitos deletérios sobre o coração (KAUR et al., 2006; DHINGRA et al., 2007; KAUR et al., 2009).

Nossos dados demonstram ainda, uma grande cardiotoxicidade provocada pelo DN, indicada pela redução do biomarcador de lesões cardíacas Troponina I. O estudo de Zaugg et al. (2001) mostrou que cultura de células de miócitos ventricular de rato quando submetido a tratamento com esteróides anabolizantes possui um percentual de viabilidade menor do que o grupo controle e essa viabilidade é dose-dependente, promovendo acentuada redução no número de células na cultura em concentrações de EAA muito elevada. Ainda de acordo com esse trabalho é possível perceber que a alteração na quantidade de células é devido a indução da apoptose dos miócitos pelo anabolizante, pois se observa uma grande fragmentação do DNA nessas

células e uma redução na relação entre as proteínas não apoptótica Bcl-2 e a apoptótica Bax, com aumento dessa ultima e redução da primeira. Baseado nos dados de Zaugg et al. (2001) podemos especular que o aumento do colágeno no tecido cardíaco, como observado no nosso estudo, seja resultado de processo apoptótico das fibras cárdicas induzida pelo anabolizante, e que isso também pode ter resultado nas alterações observadas nas concentrações da Troponina I cardíaca. Com a redução dos miócitos do ventrículo esquerdo que é possível ocorrer devido a apoptose no grupo DECA, baseado nos dados da literatura discutidos acima, podese esperar que o local ocupado por essas células anteriormente, seja preenchido com tecido cicatrizante, como o colágeno, além disso, com a morte das células cardíacas, poderá ocorrer um aumento das concentrações plasmáticas de troponina I e, consequentemente, uma redução na concentração desse biomarcador no tecido cardíaco (DAUBERT e JEREMIAS, 2010).

Vários estudos podem demonstrar uma relação entre o aumento do TNF-α e redução da Troponina I no tecido cardíaco (ZAUGG et al., 2001; SHEN et al., 2006; DAUBERT e JEREMIAS, 2010). Isso ocorre provavelmente porque o tratamento com DN causa efeitos prejudiciais às células cardíacas, promovendo aumento do TNF-α e consequentemente um estado inflamatório nesse tecido (HUGHES et al., 1995; DU TOIT et al., 2005; LIN et al., 2011). O aumento da citocina pró-inflamatória pode ser um dos mecanismos responsáveis pela redução na concentração tecidual da troponina I observado nos nossos resultados, pois ela é capaz de induzir apoptose dos cardiomiócitos (ZAUGG et al., 2001;SHEN et al., 2006), levando à morte das células cardíacas ventriculares, o que consequentemente provocaria redução da troponina I no tecido cardíaco, uma vez que, essa citocina é uma proteína estrutural encontrada exclusivamente no interior das células musculares cardíacas (DAUBERT e JEREMIAS, 2010).

6 CONCLUSÃO

Concluindo, doses elevadas de DN foram capazes de provocar remodelamento, hipertrofia e injúria cardíaca. Essas alterações estão relacionadas com o aumento da atividade da ECA e o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório decorrente do aumento de citocinas com caráter inflamatório como o TNF-α e IL-6, e redução de citocina com atividade anti-inflamatória como a IL-10. DN ainda é capaz de promover prejuízo na resposta do RBJ, provavelmente em decorrência da hipertrofia cardíaca, e esse prejuízo do RBJ pode ser resultante de um efeito dose-dependente. Juntas, essas anormalidades contribuem para o estabelecimento e manutenção da hipertensão arterial nos animais submetidos ao tratamento com DN.

7 REFERÊNCIAS

ABRAMOFF, M. D.; MAGELHAES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36-42, 2004.

AKAR, F. G.; SPRAGG, D. D.; TUNIN, R. S.; KASS, D. A.; TOMASELLI, G. F. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. **Circulation Research**, v. 95, p. 717-725, 2004.

ANDRADE, T. U.; PINTO, V. D.; MEDEIROS, A. R.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; SAMPAIO, K. N; BISSOLI, N. S. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 7, p. 606-11, 2007.

ANDRADE, T. U.; SANTOS, M. C.; BUSATO, V. C.; MEDEIROS, A. R.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, 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**, v. 39, n. 1, p. 27 – 32, 2008.

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

AVIADO, D. M.; AVIADO, D. G. The bezold-jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 940, p. 48-58, 2001.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 93, p. 43-48, 2005.

BISSOLI, N. S.; CICILINI, M. A.; VASQUEZ, E. C.; CABRAL, A. M. The diuretic chlortalidone normalizes baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes in DOCA-salt hypertensive rats. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 4, p. 483-91, 2000.

BISSOLI, N. S.; MEDEIROS, A. R.; SANTOS, M. C.; BUSATO, V. C.; JARSKE, R. D.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; 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**, v. 59, n. 6, p.379-84, 2009.

- BOEHM, E. A.; JONES, B. E.; RADDA, G. K.; VEECH, R. L.; CLARKE, K. Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, p. H977-H983, 2001.
- BRANCACCIO, P.; LIMONGELLI, F. M.; MAFFULLI, N. Monitoring of serum enzymes in sport. **British Journal of Sports Medicine**, v. 40, p. 96–97, 2006. CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: Interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 521-532, 1997.
- CARLINI, E. A. (supervisão). **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil**: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005. São Paulo: CEBRID Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP Universidade Federal de São Paulo, 2006.
- CARRASCO, J. L. M.; ZAMBRANO, S.; BLANCA, A. J.; MATE, A.; VAZQUEZ, C. M. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-Kb. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 21, 2010.
- CATO, A. C.; NESTL, A.; MINK, S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. **Science's STKE**, v. 138, 2002.
- CHEN, Y. F.; NAFTILAN, A. J.; OPARIL, S. Androgen-Dependent Angiotensinogen and Renin Messenger RNA Expression in Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 19, p. 456-463, 1992.
- CUNHA, T. S.; MOURA, M. J.; BERNARDES, C. F.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. **Hypertension**, v. 46, p. 1010–1015, 2005.
- DAUBERT, M. A.; JEREMIAS A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. **Vascular Health and Risk Management**, v. 6, p. 691-699, 2010.
- DHINGRA, S.; SHARMA, A. K.; SINGLA, D. K.; SINGAL, P. K. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-_ and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, p. H3524–H3531, 2007.

- DO CARMO, E. C.; FERNANDES, T.; KOIKE, D.; DA SILVA, N. D. JR.; MATTOS, K. C.; ROSA, K. T.; BARRETTI, D.; MELO, S. F.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C.; DE OLIVEIRA, E. M. Anabolic Steroid Associated to Physical Training Induces Deleterious Cardiac Effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 10, p. 1836 -1848, 2011.
- DU TOIT, E. F.; ROSSOUW, E.; VAN ROOYEN, J.; LOCHNER, A. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion injury. **Cardiovascular Journal of South Africa**, v. 16, n. 1, p. 21 28, 2005.
- EL-MAS, M. M.; AFIFY, E. A.; MOHY EL-DIN, M. M.; OMAR, A. G.; SHARABI, F. M. Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 38, p. 754 -763, 2001.
- EVANS, N. A. Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. **British Journal of Sports Medicine**, v. 31, p. 54–8, 1997.
- EVANS, N. A. Anabolic steroids: Answers to the bigger questions. **The Journal of Musculoskeletal Medicine**, v. 21, p. 166-178, 2004.
- EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **American Journal of Sports Medicine**, v. 32, p. 534-542, 2004.
- FONTANA, K.; OLIVEIRA, H. C.; LEONARDO, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Adverse effect of the anabolic–androgenic steroid mesterolone on cardiac remodelling and lipoprotein profile is attenuated by aerobicz exercise training. **International Journal of Clinical and. Experimental Pathology**, v. 89, p. 358–366, 2008.
- FERMO, R. S.; REGO, J. N. I.; FRANQUINI, J. V.; ANDRADE, T. U. Efeito da suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em ratos. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 1, p. 111-121, 2008.
- FERRARIO, C. M.; STRAWN W. B. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. **American Journal of Cardiology**, v. 98, p. 121–128, 2006.

- FRANKE, W. W.; BERENDONK, B. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1262- 1279. 1997.
- GIANNATTASIO, C.; SERAVALLE, G.; BOLLA, G. B.; CUTTANEO, B. M.; CLE'ROUX, J.; CUSPIDI, C.; SAMPIERI, L.; GRASSI, G.; MANCIA, G. Cardiovascular receptor reflexes in normotensive athletes with cardiac hypertrophy. **Circulation**, v. 82, p. 1222-1229, 1990.
- GRASSI, G.; GIANNATTASIO, C.; CLE´ROUX, J.; CUSPIDI, C.; SAMPIERI, L.; BOLLA, G. B.; MANCIA, G. Cardiopulmonary reflex before and after regression of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. **Hypertension**, v. 12, p. 227-237, 1988.
- GURANTZ, D.; COWLING, R. T.; VILLARREAL, F. J.; GREENBERG, B. H. Tumor Necrosis Factor-α Upregulates Angiotensin II Type 1 Receptors on Cardiac Fibroblasts. **Circulation Research**, v. 85, p. 272-279, 1999.
- HANA, H. Y.; KHALIL, W. K. B.; ELMAKAWY, A. I.; ELMEGEED, G. A. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 110, p. 284–294, 2010.
- HASSAN, N. A.; SALEM, M. F.; SAYED, M. A. Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. **Human & Experimental Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 273–283, 2009.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n.10, p. 2181–2187, 2002.
- HIROTA, H.; YOSHIDA, K.; KISHIMOTO, T.; TAGA, T. Continuous activation of gpl30, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 4862-4866, 1995.
- HUGHES, T.K.; FULEP, E.; JUELECH T.; SMITH, E.M.; STANTON, G, J. Modulation of immune responses by anabolic androgenic steroids. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, p. 857-863, 1995.

- JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-55, 1979.
- KAUR, K.; SHARMA, A. K.; DHINGRA, S.; SINGAL, P. K. Interplay of TNF-a and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, p. 1023–30, 2006.
- KAUR, K.; DHINGRA, S.; SLEZAK, J.; SHARMA, A. K.; BAJAJ, A.; SINGAL, P. K. Biology of TNFa and IL-10, and their imbalance in heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 14, p. 113–123, 2009.
- KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 502–521, 2008.
- LEASK, A. Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis TGFβ, Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation. **Circulation Research**, v. 106, p. 1675-1680, 2010.
- LIN, C.; CHEN, S. T.; CHIEN, S. Y.; KUO, S. J.; CHEN, D. R. Use of high-dose nandrolone aggravates septic shock in a mouse model. Kaohsiung. **Journal of Medical Sciences**, v. 27, p. 222 229, 2011.
- LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; BANFI, G. Biochemistry and Physiology of Anabolic Androgenic Steroids Doping. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 362-373, 2011.
- LISE, M. L. Z.; GAMA E SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O Abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n.4, p. 364-370, 1999.
- LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and Cardiovascular Disease. **Endocrine reviews**, v. 34, n.3, p. 313-340, 2003.
- LOSEL, R. M.; FALKENSTEIN, E.; FEURING, M.; SCHULTZ, A.; TILLMANN, H. C.; HASEROTH, K. R.; WEHLING, M. Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 965–1016, 2003.
- MARK, A. L. The bezold-jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 1, p. 90-102, 1983.

MARSH, J. D.; LEHMANN, M. H.; RITCHIE, R. H.; GWATHMEY, J. K.; GREE, G. E.; SCHIEBINGER, R. J. Androgens receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation**, v. 98, p. 256-261, 1998.

MEADOR, B. M.; KRZYSZTON, C. P.; JOHNSON, R. W.; HUEY, K. A.. Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1 β , and TNF- α responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, p. 991-997, 2008.

MEDEI, E.; MAROCOLO, M.; RODRIGUES, D. C.; ARANTES, P. C.; TAKIYA, C. M.; SILVA, J.; RONDINELLI, E.; GOLDENBERG, R. C.; CARVALHO, A. C.; NASCIMENTO, J. H. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: Cellular, ionic and molecular mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, p. 165–175, 2010.

MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; MATHIAS, S. C.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 73, p. 135-142, 1998.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

MORROW, D. A.; CANNON, C. P.; JESSE, R. L.; NEWBY, L. K.; RAVKILDE, J.; STORROW, A. B.; WU, A. H; CHRISTENSON, R. H. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 115, n. 13, p. 356-75, 2007.

MOUBARAK, M.; JABBOUR, H.; V. SMAYRA, V.; CHOUERY, E.; Y. SALIBA, Y.; V. JEBARA, Y.; FARÈS, N. Cardiorenal Syndrome in Hypertensive Rats: Microalbuminuria, Inflammation and Ventricular Hypertrophy. **Physiological Research**, v. 61, p. 13-24, 2012.

NOVAES, P. D.; IRIGOYEN, M. C.; MOURA, M. J.; MARCONDES, F. K. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. **Life Sciences**, v. 89, n. 17-18, p. 631-7, 2011.

PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 38, n. 4, p. 644-651. 2006.

PELOUCHET, V.; DIXON, I.M.C.; GOLFMAN, L.; BEAMISH, R.E.; DHALLA, N.S. Role of extracellular matrix proteins in heart function. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 129, p.101-120, 1994.

PEREIRA JUNIOR, P. P.; CHAVES, E. A.; COSTA E SOUZA, R. H.; MASUDA, M. O.; CARVALHO, A. C. C.; NASCIMENTO, J. H. M. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **European Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 487-494, 2006.

RASBAND, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997-2007.

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**, v. 293, p. H3575 – H3583, 2007.

RIEZZO, I.; DI PAOLO, M.; NERI, M.; BELLO, S.; CANTATORE, S.; D'ERRICO, S.; DINUCCI, D.; PARENTE, R.; POMARA, C.; RABOZZI, R.; TURILLAZZI, E.; FINESCHI, V. Anabolic Steroid - and Exercise - Induced Cardio-Depressant Cytokines and Myocardial β1 Receptor Expression in CD1 Mice. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 275-284, 2011.

RIEZZO, I.; DE CARLO, D.; NERI, M.; NIEDDU, A.; TURILLAZZI, E.; FINESCHI, V. Heart Disease Induced by AAS Abuse, Using Experimental Mice/Rats Models and the Role of Exercise-Induced Cardiotoxicity. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 11, p. 409-424, 2011.

SAITO, H.; PATTERSON, C.; HU, Z.; RUNGE, M. S.; TIPNIS, U.; SINHA, M.; PAPACONSTANTINOU, J. Expression and self-regulatory function of cardiac interleukin-6 during endotoxemia. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, p. H2241–H2248, 2000.

SERRA, C. P.; CÔRTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of Agiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, p. 424-32, 2005.

SCHIEFFER, B.; SCHIEFFER, E.; HILFIKER-KLEINER, D.; HILFIKER, A.; KOVANEN, P.T.; KAARTINEN, M.; NUSSBERGER, J.; HARRINGER, W.; DREXLER H. Expression of Angiotensin II and Interleukin 6 in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Potential. Implications for Inflammation and Plaque Instability. **Circulation**, v. 101, p. 1372-1378, 2000.

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

SILLIVAN, M. L.; MARTINEZ, C. M.; GALLAGHER, E. J. Atrial fibrillation and anabolic steroids. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 5, p. 851-857, 1999.

SPINALE, F. G. Matrix Metalloproteinases Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. **Circulation Research**, v. 90, n. 5, p. 520-530, 2002.

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. **Endocrine Journal**, v. 51, n. 4, p. 425-434, 2004.

TANNO, A. P.; DAS NEVES, V. J.; ROSA, K. T.; CUNHA, T. S.; GIORDANO, F. C.; CALIL, C. M.; GUZZONI, V.; FERNANDES, T.; DE OLIVEIRA, E. M.; ZHANG, Y. Z.; XING, X. W.; HE1, B.; WANG, L. X. Effects of Testosterone on Cytokines and Left Ventricular Remodeling Following Heart Failure. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, p. 847-852, 2007.

THOMAS, C. J.; HEAD, G. A.; WOODS, R. L. ANP and bradycardic reflexes in hypertensive rats: influence of cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 32, p. 548-555, 1998.

TOIT, E. F.; ROSSOUW, E.; ROOVEN, J. V.; LOCHNER, A. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury. **Cardiovascular Journal of South Africa**, v. 16, p. 21-28, 2005.

TRIFUNOVIC, B.; NORTON, G. R.; DUFFIED, M. J.; AVRAAM, P.; WOODIWIS, A. J. An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 1096-1105, 1995.

TWERENBOLDA, R.; REICHLINA, T.; REITERA, M.; MUELLERA, C. High-sensitive cardiac troponin: friend or foe? **Swiss Medical Weekly**, v. 141, p. 1-5, 2011.

TZOULAKI, I.; MURRAY, G. D.; LEE, A. J.; RUMLEY, A.; LOWE, G. D. O.; FOWKES, F. G. R. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Soluble Adhesion

Molecules as Predictors of Progressive Peripheral Atherosclerosis in the General Population. **Circulation**, v. 112, p. 976-983, 2005.

UGGERE, T. A.; ABREU, G. R.; SAMPAIO, K. N. CABRAL, A. M..; BISSOLI N. S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 589-594, 2000.

UGGERE DE ANDRADE, T.; LOIOLA, L. Z.; ALCURE, S. M.; MEDEIROS, A. R.; SANTOS, M. C.; MOYSÉS, M. R.; ABREU, G. R.; LENZ, D.; BISSOLI, N. S. Role of the rennin–angiotensin system in the nandrolone-decanoate-induced attenuation of the Bezold–Jarisch reflex. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 89, p. 1–7, 2011.

URHAUSEN, A.; HOPLES, R.; KINDERMANN, W. One — and two — dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 58, p. 633-640, 1989.

URHAUSEN, A.; ALBERTS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart**, v. 90, p. 496-501, 2004.

VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; MATHIAS, S. C. B.; CABRAL, A. M. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. **Journal of the autonomic Nervous System**, v. 73, p. 135-142, 1998.

VEELKEN, R.; HILGERS, K. F.; DITTING, T.; LEONARD, M.; MANN, F. F. E.; GEIGER, H. Impaired cardiovascular reflexes precede deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension**, v. 24, p. 564-570, 1994. VON DER THÜSEN, J. H.; KUIPER, J.; VAN BERKEL, T. J.; BIESSEN, E. A. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 133–166, 2003.

WANG, M.; TSAI, B. M.; KHER A.; BAKER, L. B.; G. WAIRIUKO, G. M.; MELDRUM, D. R. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. 221–226, 2005.

WEI, M.; KUUKASJARVI, P.; LAURIKKA, J.; KAUKINEN, S.; IISALO, P.; LAINE, S.; LAIPPALA, P.; METSÄNOJA, R.; TARKKA, M. Cytokine responses and myocardial injury in coronary artery bypass grafting. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 61, p. 161-6, 2001.

WILLIAMSON, D. J. Anabolic steroid use among students at a British college of technology. British Journal of Sports Medicine, v. 27, n. 3, p. 200-201. 1993.

XIAO, H.; CHEN, Z.; LIAO, Y.; CHENG, X.; LIU, K.; WANG, Y.; WANG, M.; GUO, H. Positive Correlation of Tumor Necrosis Factor-α Early Expression in Myocardium and Ventricular Arrhythmias in Rats with Acute Myocardial Infarction. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 3, p. 285 – 291, 2008.

YANG, S.; ZHENG, R.; HU, S.; MA, Y.; CHOUDHRY, M. A.; MESSINA, J. L.; RUE III, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Mechanism of cardiac depression after trauma-hemorrhage: increased cardiomyocyte IL-6 and effect of sex steroids on IL-6 regulation and cardiac function. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H2183–H2191, 2004.

YOSHIDA, K.; TAGA, T.; SAITO, M.; SUEMATSU, S.; KUMANOGOH, A.; TANAKA, T.; FUJIWARA, H.; HIRATA, M.; YAMAGAMI, T.; NAKAHATA, T.; HIRABAYASHIO, T.; YONEDAS, T.; TANAKAII, K.; WANG, W.; MORI, C.; SHIOTA, K.; YOSHIDA, N.; KISHIMOTO, T. Targeted disruption of gpl30, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 407-411, 1996.

ZAUGG, M.; JAMALI, N. Z.; LUCCHINETTI, E.; XU, W.; ALAM, M.; SHAFIQ, S. A.; SIDDIQU, M.A.Q. Anabolic-Androgenic Steroids Induce Apoptotic Cell Death in Adult Rat Ventricular Myocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, p. 90 – 95, 2001.

ZHANG, Y. Z.; XING, X. W.; HE, B.; WANG, L. X. Effects of Testosterone on Cytokines and Left Ventricular Remodeling Following Heart Failure. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, p. 847-852, 2007.