

**TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA
INDUZ REMODELAMENTO CARDÍACO E RENAL EM RATAS, SEM
MODIFICAR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: O PAPEL DO SISTEMA
DE ANP**

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

Doutorado em Ciências Fisiológicas

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

**VITÓRIA
2016**

**TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA
INDUZ REMODELAMENTO CARDÍACO E RENAL EM RATAS, SEM
MODIFICAR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: O PAPEL DO SISTEMA
DE ANP**

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

Orientadora: Dr^a Nazaré Souza Bissoli

Co-orientador: Dr. Tadeu Uggere de Andrade.

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

Doutorado em Ciências Fisiológicas

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

**VITÓRIA
2016**

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA INDUZ REMODELAMENTO CARDÍACO E RENAL EM RATAS, SEM MODIFICAR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: O PAPEL DO SISTEMA DE ANP

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

Aprovada em 03 de Junho de 2016,

Banca Examinadora:

Dr^a Denise Coutinho Endringer (UVV/UFES)

Dr^a Bianca Prandi Campagnaro (UVV)

Dr^a Sônia Alves Gouvêa (UFES)

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

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

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

Esta tese é dedicada primeiramente à Deus, que me concedeu vida e saúde. Aos meus pais e familiares por todo carinho e dedicação, ao meu noivo pelo apoio incondicional e meus orientadores, por cuidarem de mim e dividirem comigo seu conhecimento.

AGRADECIMENTOS

É com grande emoção que inicio os agradecimentos de minha tese, um fechamento de ciclo, um sonho realizado. Primeiramente agradeço a Deus pai, criador de todas as coisas e que me concede o dom da vida, que me deu coragem e força para batalhar, e me abençoou grandemente, sempre cuidando dos meus caminhos e abrindo as portas certas para mim.

Agradeço a Deus também, por ter me concedido a graça de ser criada por pessoas maravilhosas, meus pais José e Geronilda, que me educaram e sempre me ampararam, eles fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão Ricardo, por toda ajuda e incentivo, ele é um entusiasta e mesmo quando eu desanimava, sempre tinha palavras de carinho e força para me dar. Passamos por momentos muito difíceis nesses 3 anos de doutorado, mas Deus nos deu forças e superamos todas as dificuldades. Essa vitória é para vocês.

Ao meu presente maior, meu noivo Leonardo, nossa história cresceu nesses 3 anos, e durante todo esse tempo encontrei em você um porto seguro, um alento para as turbulações que passei nesse período, palavras de incentivo, apoio, carinho não faltaram, foram tantos momentos que você foi essencial que nem consigo descrever, só posso agradecer a você por ser esse homem maravilhoso e por estar sempre comigo. Muito obrigada meu amor!

Minha orientadora Nazaré, que me recebeu de braços abertos no laboratório e me aceitou como sua aluna, mesmo quando isso parecia tão difícil, muito obrigada por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia, e cuidar de mim em todos os momentos, muito mais que uma orientadora você me ensinou coisas que levarei para a vida toda. Ao meu co-orientador, Tadeu que é meu anjinho da guarda, muito obrigada pela paciência, ensinamentos, palavras de afeto e estímulo. Em nenhum momento você desacreditou de mim, mesmo quando eu desacreditei você sempre me incentivou. Vocês dois são meu exemplos de pesquisadores e mais do que isso, são exemplos de pessoas! Mais do que bons pesquisadores, são pessoas incríveis e que tem um coração enorme! Agradeço a Deus por ter sido “criada” por vocês. Obrigada por tudo, e espero continuar perturbando vocês por um bom tempo.

E por falar em anjo, não posso esquecer a amiga Ewelyne Lima, que por vezes deixou os seus problemas de lado para me ajudar, seja na confecção dessa tese,

seja para me ouvir e compartilhar as angústias e anseios que essa etapa da minha vida produziram. Muito obrigada por tudo, você é mais que uma amiga é uma irmã.

Meus amigos queridos, muito obrigada pelo apoio e carinho que vocês me dedicaram, ao Andrews Marques que esteve comigo desde o começo dessa pesquisa, e colaborou intensamente para que esse trabalho saísse do papel, as amigas Drielle, Ana Cláudia, Michele e Mírian, que sempre me ajudaram, seja com palavras ou com ações. E claro que não posso esquecer dos amigos que a UFES me deu. Começando pela Prof. Sônia, um exemplo de pessoa, profissional e ser humano maravilhoso e dedicado, obrigada por todos os ensinamentos recebidos. Aos amigos do Lab. De Regulação Neurohumoral da Circulação, especialmente Simone e Vinicius, fico sem palavras para descrever como vocês me ajudaram nesse período, sempre com um sorriso estampado no rosto e uma ideia na cabeça, me colocando pra cima, ajudando e incentivando, vocês são 10! Não posso esquecer-me do Erick e Fabrício, que me acolheram de braços e coração abertos. À amiga Pollyana Peixoto, eu me ajudou demais e tantas vezes, nos mínimos detalhes, fazendo com que meus dias fossem mais alegres.

Aos colegas do LHE, Phablo, Glauciene, Karine, Isabela, Polyana, Marcos, Antônio, Mariana, Nara, Marília, Carol, Edgar... Muito obrigada por tudo!!!

Aos colegas da pós-graduação que possibilitaram boas risadas, conversas e dividiram comigo o sofrimento das disciplinas, falta de tempo e horas mal dormidas, meu muito obrigado.

A professora Adelina Martha dos Reis e todos os alunos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo (ICB-UFMG) especialmente ao aluno Mauro Sérgio, que gentilmente cederam seu tempo e espaço para que eu realizasse os experimentos de RT-PCR, mais que isso, me receberam muito bem e fizeram com que me sentisse em casa.

Esta tese foi feita por muitas mãos, não necessariamente as pessoas me ajudaram efetivamente a escrevê-la, mas o apoio e dedicação incondicional de todos vocês foi o que fez a tese e o artigo saírem da cabeça e irem para o papel. Muito obrigada a todos que ajudaram de alguma maneira.

Ninguém faz nada sozinho, tão pouco eu.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Clarice Lispector

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Justificativa.....	12
1.2	Revisão de literatura	15
1.2.1	Hormônios sexuais.....	15
1.2.2	Os esteroides anabólicos androgênicos	19
1.2.3	Peptídeo Natriurético Atrial	29
1.2.4	Exercício físico	34
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral:.....	39
2.2	Objetivos específicos:.....	39
3	MÉTODOS	40
3.1	Animais experimentais.....	40
3.2	Procedimento cirúrgico	41
3.3	Exercício físico resistido.....	41
3.4	Avaliação do ciclo estral pelo esfregaço vaginal.....	42
3.5	Coleta e análises urinárias	43
3.6	Avaliação da pressão arterial média e Reflexo Bezold-Jarisch.....	43
3.7	Retirada dos tecidos e análises histológicas	44
3.8	Análises bioquímicas.....	45
3.9	Expressão gênica de ANP, NPR-A e C por Real Time PCR (RT-PCR)	46
3.10	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERENCIAS	76
8	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química dos principais hormônios sexuais masculinos e femininos	15
2	Mecanismo de ação dos hormônios esteroides. Modelo resumido representando a via genômica e não-genômica	19
3	Síntese das diferentes modificações estruturais realizadas na molécula da testosterona e que culminaram na criação dos esteroides anabólicos androgênicos	20
4	Estrutura química e modificações estruturais na molécula de Decanoato de nandrolona	22
5	Estrutura molecular do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Peptídeo Natriurético tipo B (BNP) e Peptídeo Natriurético tipo C (CNP). Na figura é possível observar as etapas de clivagem do peptídeos, de pró-hormônio à hormônio	30
6	Afinidades dos peptídeos natriuréticos pelos receptores A, B e C, bem como suas principais vias de sinalização intracelular	32
7	Valores de expressão gênica de ANP no átrio direito de ratas tratadas com DN e/ou submetidas a exercício físico resistido	50
8	Resultado da expressão gênica do receptor A e C de ANP no rim dos animais tratados com DN e/ou submetidos ao exercício físico resistido em unidades arbitrárias (UA)	51
9	Figuras representativas das lâminas coradas com H&E usadas para a avaliação da morfometria cardíaca e avaliação da hipertrofia cardíaca	53
10	Percentual da área de colágeno cardíaco depositado no tecido cardíaco dos animais nos diferentes grupos de tratamento	54
11	Avaliação da hipertrofia macroscópica renal pela razão massa renal/comprimento da tíbia e análise da área percentual de colágeno no córtex renal	56
12	Avaliação da hipertrofia muscular e eficiência anabólica do DN, pela razão massa do gastrocnêmio/comprimento da tíbia nos diferentes grupos de tratamento	59

LISTA DE TABELAS

1	Valores de creatinina e ureia (soro) e excreção de sódio (urina) dos animais tratados com Decanoato de nandrolona e/ou submetidos a exercício físico por 4 semanas	57
2	Percentual de redução na pressão arterial diastólica (PAD) e na frequência cardíaca (FC) induzidas pela aplicação <i>in bolus</i> de fenilbiguanida nos grupos S e OVX tratados com DN e/ou submetidos a exercício físico resistido	58
3	Valores de lactato sanguíneo dos grupos submetidos ao exercício físico resistido	60
4	Ganho de peso dos animais tratados com Decanoato de nandrolona e/ou submetidos a exercício físico resistido	60
5	Valores de testosterona e estrogênio séricos das ratas tratadas e/ou submetidas a exercício físico resistido por 4 semanas	61

RESUMO

BRASIL, G.A. **Tratamento crônico com Decanoato de Nandrolona induz remodelamento cardíaco e renal em ratas, sem modificar parâmetros fisiológicos: o papel do sistema de ANP.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2016.

Esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são drogas utilizadas de maneira ilícita, com finalidade principalmente estética, tanto por homens quanto por mulheres. Devido à escassez de pesquisas investigando as ações destes hormônios no sistema cardiovascular feminino, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do tratamento crônico com Decanoato de nandrolona (DN) em altas doses sobre o sistema de peptídeo natriurético em ratas submetidas ou não à atividade física resistida e qual a influência da retirada de estrogênio no tratamento. Para tanto os animais foram separados aleatoriamente em 8 grupos (n=10 cada): SHAM e OVX, foram tratadas com o veículo (óleo de amendoim) 2x por semana e não foram submetidas a exercício físico. SE e OVXE, que receberam o veículo e foram submetidas a exercício físico resistido (5 X por semana); SD e OVXD, tratadas com DN (20mg/kg/semana, divididas em 2 doses) e não exercitadas e os grupos SDE e OVXDE, que foram tratadas e exercitadas. Os animais OVX foram submetidos à ovariectomia bilateral e os tratamentos iniciaram 21 dias após a cirurgia e foram mantidos por 4 semanas. Após esse período a sensibilidade do Reflexo Bezold Jarisch (RBJ) foi avaliada por meio da aplicação de doses randomizadas de fenilbiguanida. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para a coleta de urina 24h e posterior análise da excreção de creatinina, uréia e sódio. O coração e rim foram retirados e armazenados em formol para as avaliações de hipertrofia (H/E) e deposição de colágeno (Picrossirius red) por histologia. O átrio direito e o rim foram congelados em nitrogênio líquido para avaliação da expressão do ANP e os receptores NPR-A e NPR-C respectivamente por meio de RT-PCR. Após tratamento os animais apresentaram aumento da expressão gênica de ANP no átrio e redução do receptor A no rim nos grupos tratados com DN. O receptor C apresentou redução nos animais que foram tratados e submetidos a exercício físico resistido (SDE e OVXDE). Além disso, o tratamento promoveu hipertrofia e deposição de colágeno no tecido renal e cardíaco. Adicionalmente os animais apresentaram hipertrofia muscular (musculo gastrocnêmio) e melhora do desempenho atlético observado pelo maior número de saltos por minuto nos grupos tratados. O tratamento reduziu a concentração de estrogênio nos grupos S e aumento da testosterona plasmática. Não foi possível observar mudança na pressão arterial média, sensibilidade do RBJ e excreção de sódio, creatinina e ureia, e a ovariectomia pouco modificou o padrão de resposta ao tratamento. Deste modo, podemos observar que o tratamento com DN modificou o sistema de ANP e este sistema, pode ter promovido efeito cardioprotetor, observado pelo não aumento da pressão arterial e sensibilidade do RBJ.

Palavras-chave: Decanoato de nandrolona; treinamento resistido; ANP.

ABSTRACT

BRASIL, G.A. **Treatment with nandrolone decanoate promotes cardiac and renal remodeling in female rats, without change the physiological parameters: The role of ANP system.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2016.

Anabolic Androgenic Steroids (AAS) are drugs used in an illicit manner, with mostly aesthetic purposes, by both men and women. Due to the few researches about the action of these hormones in female cardiovascular system, the aim of the present study was to evaluate the effect of chronic treatment with nandrolone decanoate (ND), in high dose in natriuretic peptide system of female rats submitted or not to physical activity and which is the influence of estrogen withdrawal for the treatment. For that the animals were randomly divided into 8 groups (n=10 each): SHAM and OVX, were treated with vehicle (peanut oil) twice a week and were not submitted to physical exercise. SE and OVXE, were treated with vehicle and were submitted to resistive physical exercise (5 times a week); SD and OVXD, treated with ND (20mg/kg/week, divided into 2 doses) and were not exercised, and the groups SDE and OVXDE, which were treated and exercised. The OVX animals were submitted to bilateral ovariectomy and the treatments started 21 days after the surgery and were maintained for 4 weeks. After that period, the Bezold-Jarisch reflex (BJR) sensitivity was evaluated by random doses of phenylbiguanide administration. The animals were maintained in metabolic cages for 24h urine collection and after that creatinine, urea and sodium excretion were evaluated. The heart and kidney were maintained in formalin buffer for evaluation of hypertrophy (H/E) and collagen deposition (Picrossirius red) by histology. The right atrium and kidney were frozen in liquid nitrogen for evaluation of gene expression of ANP and NPR-A and NPR-C expression by RT-PCR. After treatment with ND the animals presented increase on gene expression of ANP on atrium and decrease of NPR-A on kidney. The NPR-C shows reduction on the groups that was treated with ND and exercised (SDE and OVXDE). Besides that, the treatment promotes hypertrophy and collagen deposition on heart and kidney. Additionally the animals presented muscle hypertrophy (gastrocnemius muscle) and improve on athletic performance observed by increase on jumps/minute on ND treated groups. The treatment decrease estrogen concentration on Sham groups and increase on plasmatic level of testosterone. It was not possible to observe change on mean arterial pressure, BJR sensitivity and sodium, creatinine and urea excretion. The ovariectomy little changes the pattern of response to treatment. Thus, we can observe that the treatment with ND changed the ANP system and that result could promote cardio protective effect, observed by not increase on mean arterial pressure and BJR sensitivity.

Key words: Nandrolone decanoate, resistive training, ANP.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Os hormônios sexuais são responsáveis pelos caracteres sexuais masculinos e femininos e diversas ações são atribuídas a esses, como por exemplo, cardiovasculares e endócrinos (Miller, 1988). Efeitos cardioprotetores do estrogênio, principal hormônio sexual feminino, foram previamente reportados, e seus benefícios podem ser observados por meio da menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV) mundiais em mulheres quando comparado aos homens, entretanto, esses dados se igualam quando a mulher atinge a menopausa, período onde há queda na produção de estrogênio endógeno (Mozaffarian et al., 2016). Por sua vez, a testosterona, principal hormônio sexual masculino, possui ações endócrinas de estímulo na síntese de proteína e de força muscular, o que proporcionou a formulação de um grupo de fármacos análogos, denominado esteróides anabólicos androgênicos (EAA; Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

O abuso de EAA tem sido considerado um problema de saúde pública grave, entre os adolescentes e jovens de ambos os sexos (Amsterdam, Opperhuizen & Hartgens, 2010; Thiblin & Petersson, 2005), sendo que o Decanoato de nandrolona (DN) é um dos EAA mais utilizados e estudados (Busardò et al., 2015; Perry et al., 2005).

Apesar de a maioria dos estudos abordarem EAA e o sexo masculino, o uso abusivo dessas substâncias tem aumentado entre as mulheres (Onakomaiya & Henderson, 2016; Elliot & Goldberg, 2000), e há evidências de que os mesmos alteram a fisiologia reprodutiva feminina (Belardin et al., 2014; Camargo et al., 2011). Portanto, outros estudos precisam ser conduzidos para elucidar as alterações induzidas por EAA no sexo feminino, em particular as associadas com o sistema

cardiovascular, um alvo importante dos efeitos adversos dos EAA (Fineschi et al., 2001; Dickerman et al., 1995).

Administração de doses elevadas de DN, tem sido implicado com elevação da pressão arterial (Lima et al., 2015; Franquini et al., 2013; Hassan & Kamal, 2013), hipertrofia cardíaca, deposição de colágeno na extracelular matriz (Tanno et al., 2011; Bissoli et al., 2009), desequilíbrio em citocinas inflamatórias (Lima et al., 2015; Riezzo et al., 2014; Franquini et al., 2013), assim como prejuízos no controle reflexo da pressão arterial (Franquini et al., 2013; Andrade et al., 2011; Bissoli et al., 2009).

O nosso grupo demonstrou que altas doses de DN alteram o controle do sistema cardiovascular pelo reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) em machos, de maneira dose e tempo dependentes (Franquini et al., 2013; Bissoli et al., 2009; Andrade et al., 2008), associados com hipertrofia cardíaca, um dos fatores que alteram o RBJ (Bissoli et al., 2009), e envolvendo a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Andrade et al., 2011).

O ANP se apresenta como um dos mecanismos humorais importantes no controle do sistema cardiovascular (McKie et al., 2010; Holtwick et al., 2003), e sua alteração tem sido amplamente associada com hipertrofia (Ruskoaho, 1992) e insuficiência cardíaca (Klein, Gillivrayd & McKenzie, 1995). Além disso, foi demonstrada a associação de hipertrofia cardíaca, ANP (Holtwick et al., 2003; Kishimoto, Rossi & Garbers, 2001; Knowles et al., 2001) e RBJ (Bissoli et al., 2000; Imaizumi et al., 1987). Entretanto, todos esses estudos foram realizados em machos, não havendo informação relacionada com a influência do ANP sobre parâmetros fisiológicos cardiovasculares, tais como RBJ, hipertrofia cardíaca, remodelamento cardíaco, entre outros. Por esse motivo, foi de interesse deste estudo avaliar o sistema do ANP em ratas tratadas com DN.

Adicionalmente, o exercício físico tem demonstrado efeitos positivos sobre o ANP (Endlich et al., 2011), proteção contra eventos isquêmicos (Kruk, 2007; Le Page et al., 2009) e aumento em enzimas antioxidantes (Chaves et al., 2006). Em contrapartida, o uso de DN prejudica os efeitos benéficos do exercício físico (Lima et al., 2015; Marques-Neto et al., 2014). No entanto, o efeito de EAA sobre reflexos cardiovasculares (RBJ) e fatores humorais (ANP) em ratas treinadas ainda não foram estudados.

Portanto nossa hipótese é que administração de DN em ratas pode alterar o sistema do ANP e o RBJ. Adicionalmente, visto que existem efeitos cardioprotetores do estrogênio e do exercício, é possível que suas ações interfiram nos efeitos deletérios do DN.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Hormônios sexuais

Os hormônios sexuais são produzidos pelas gônadas por meio de fino ajuste endócrino produzido pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Os principais hormônios sexuais são o estrogênio e a progesterona nas mulheres e a testosterona e di-hidrotestosterona nos homens (Figura 1). O aumento na produção destes hormônios se dá, geralmente, na puberdade, e é responsável pelos caracteres sexuais secundários (Miller, 1988).

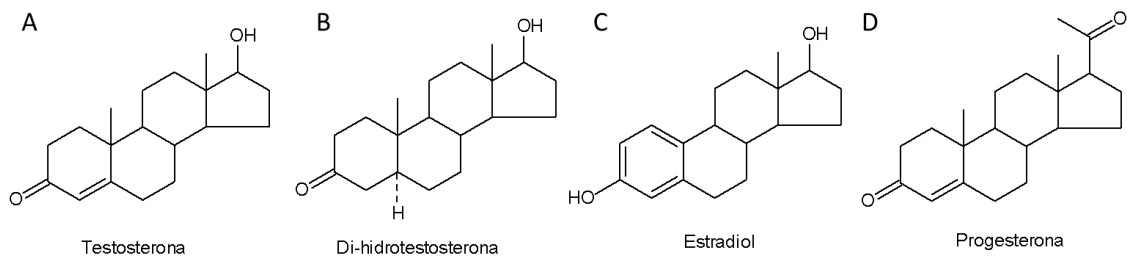


Figura 1: Estrutura química dos principais hormônios sexuais masculinos (A e B) e femininos (C e D).

Nos primórdios dos estudos endócrinos, rapidamente se associou a importância das gônadas na manutenção das características sexuais masculinas e femininas. Em meados o século XIX, estudos já haviam demonstrado a importância dos ovários e testículos para o organismo, demonstrando que a gonadectomia produzia modificações fisiológicas, e o tratamento com extratos destes órgãos às preveniam (Martins, Rocha & Silva, 1929).

A liberação dos hormônios sexuais pelas gônadas precisa da estimulação de dois hormônios sintetizados pela hipófise, o hormônio luteizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Em ambos os sexos, os neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico liberam o hormônio estimulador da liberação de gonadotrofinas (GnRH) na circulação porta-hipofisária, que por sua vez, atua nos gonadotrofos presentes na

hipófise anterior (adenohipófise) estimulando a liberação do LH e FSH para a circulação sistêmica (Tandon & Chintala, 2001).

Nos indivíduos do sexo feminino, a produção dos hormônios sexuais é cíclica. Na primeira fase do ciclo denominada fase folicular, os hormônios LH e FSH estimulam a liberação do estrogênio dos ovários, que é o hormônio predominante nessa fase. Os folículos então imaturos têm o seu crescimento estimulado por ação do hormônio FSH e das gonadotrofinas, este crescimento culmina na ovulação que é a liberação do óvulo maduro, pronto para a fecundação (Hawkis & Matzuk, 2008). Os hormônios sexuais não são produzidos apenas nas gônadas, a glândula adrenal também contribui em parte pela produção de andrógenos e a expressão da enzima aromatase nos outros tecidos corpóreos promove a conversão de testosterona em estradiol, possibilitando ações locais desse hormônio (Miller & Auchus, 2011; Simpson et al., 2005; Longcope, 1986).

A ovulação consiste basicamente, no rompimento do folículo e liberação do óvulo para as trompas de falópio. Nessa fase, ocorre o aumento da concentração sérica de LH e estrogênio, o que é crítico para que a ovulação ocorra. No ovário, o conjunto de células da Teca que circundava o óvulo, torna-se uma estrutura fisiologicamente ativa, denominada corpo lúteo (Reed & Carr, 2015).

O corpo lúteo é responsável pela síntese e produção da progesterona, que é predominante na terceira e última fase do ciclo feminino. Nessas células, a progesterona é sintetizada a partir do colesterol, e tem por função biológica principal o estímulo da proliferação endometrial com o intuito de fixar o óvulo, caso esse seja fecundado (Reed & Carr, 2015).

No indivíduo do sexo masculino, os hormônios LH e FSH têm funções distintas. O LH atua em seus receptores presentes nas células de Leydig, estimulando-as a

produzir o hormônio testosterona, enquanto o FSH nas células de sertoli promove estímulo à espermatogênese, indiretamente a ação do LH favorece essa ação, pois o hormônio produzido pelas células de Leydig é importante para a síntese do espermatozoide (Jin & Yang, 2014).

A testosterona é o principal androgênico presente nos indivíduos do sexo masculino (Shahidi, 2001), mas também é produzida em pequenas quantidades na glândula adrenal e ovários nas mulheres. Nos homens, ela é sintetizada nos testículos a partir da molécula do colesterol, este precursor sofre diversas ações enzimáticas até originar o hormônio testosterona, que será liberado para a circulação sistêmica.

As ações fisiológicas da testosterona são moduladas nos tecidos através de ações enzimáticas. A enzima aromatase, biotransforma a testosterona em estrogênio, enquanto a enzima 5- α -redutase, produz a di-hidrotestosterona (DHT). A DHT é mais potente que a testosterona, aumentando assim, as propriedades androgênicas e anabólicas. Essa enzima está mais presente em tecidos específicos, como a próstata, onde a ação deste hormônio é mais requerida. A conversão em estrogênio induz outras ações, em tecidos alvo como cérebro e tecido adiposo (Kicman, 2008; Falkenstein et al., 2000; Cato, Nestl & Mink, 2002).

Os hormônios esteroides, família ao quais os hormônios sexuais pertencem, têm como característica importante à natureza lipídica de suas estruturas químicas. Desse modo, essas substâncias tem a capacidade de atravessar facilmente a membrana plasmática, e realizam as suas ações principalmente por meio de um mecanismo clássico, conhecido como genômico (Vasconsuelo et al., 2011; Falkenstein et al., 2000).

Nesse mecanismo de ação, o hormônio atravessa a membrana plasmática e interage com seu receptor específico nuclear. Há formação de um complexo hormônio-receptor que é translocado para o núcleo, onde atua como um fator de transcrição dependente de ligante e interage com a região do gene conhecida como elemento de resposta ao hormônio. Essa região ativa a transcrição de genes específicos, de acordo com o hormônio que é apresentado (Shahidi, 2001; Falkenstein et al., 2000). Esse mecanismo favorece uma ação em longo prazo dos hormônios, que se iniciam horas após o contato entre hormônio e o receptor, e perdura por vários dias após a interrupção (Figura 2).

Outro mecanismo de ação utilizado por esses hormônios são os mecanismos não clássicos, ou não-genômicos. A principal característica desse mecanismo é a ação rápida dos hormônios. Boa parte das substâncias utilizam proteínas de membrana para transmitir o seu sinal para a célula alvo. Nesse mecanismo, ocorre a ativação de segundos mensageiros celulares, que promovem a ampliação do sinal na célula alvo (Falkenstein et al., 2000).

Evidências sugerem que no mecanismo não-genômico, os hormônios sexuais ligam-se a receptores acoplados a proteína G, que culminam na produção de segundos mensageiros como o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), que estimula a produção da proteína kinase A (PKA), que por sua vez, estimula outros receptores de androgênicos citosólicos e causam aumento do cálcio livre celular (Cato, Nestl & Mink, 2002).

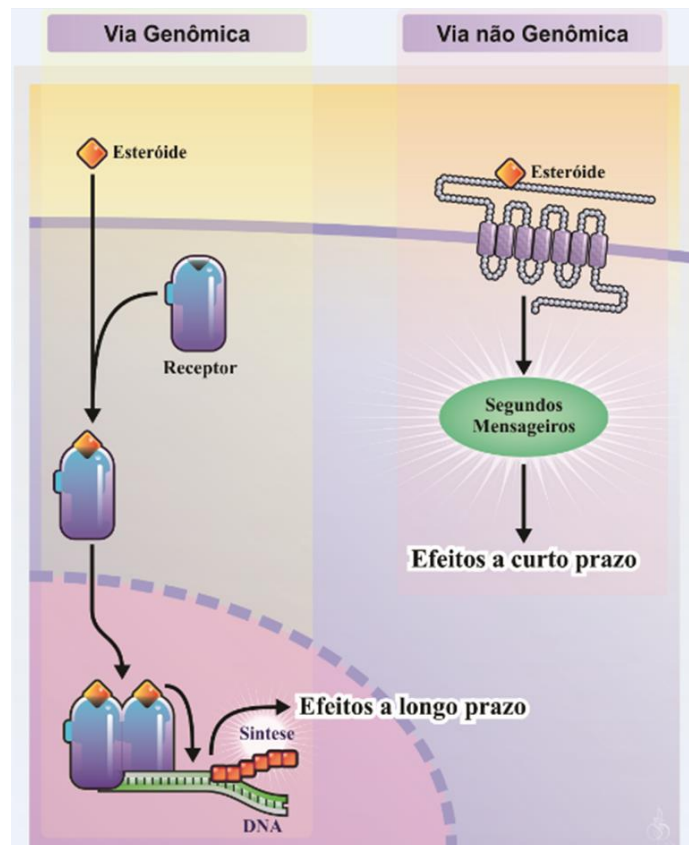


Figura 2: Mecanismo de ação dos hormônios esteroides. Modelo resumido representando a via genômica e não-genômica.

1.2.2 Os esteroides anabólicos androgênicos

A testosterona, principal hormônio androgênico masculino, possui como características fisiológicas a capacidade de proporcionar efeitos androgênicos, proporcionar caracteres sexuais primários e secundários masculinos, além de anabólicos de estimular a síntese proteica e força muscular. Diversos estudos foram realizados visando modificar estruturalmente a testosterona, especialmente na tentativa de criação de um fármaco que separasse as ações anabólicas das androgênicas, os fármacos deste grupo foram denominados esteroides anabólicos androgênicos (EAA; Kicman, 2008; Shahidi, 2001).

Os EAA são análogos sintéticos da testosterona, onde modificações estruturais foram realizadas com o intuito de reduzir a atividade androgênica e potencializar a atividade anabólica. Entretanto, não existe atualmente uma droga que seja somente anabólica e todas apresentam alguma atividade androgênica (Kuhn, 2002).

As diversas modificações estruturais realizadas criaram as diferentes classes de EAA disponíveis hoje no mercado (Figura 3). Os esteroides 17- α -substituídos, possuem a adição de um grupo metil ou etil no carbono 17, o que confere a capacidade de administração oral a essas drogas, graças à redução da biotransformação hepática (Kicman, 2008; Kuhn, 2002; Shahidi, 2001).

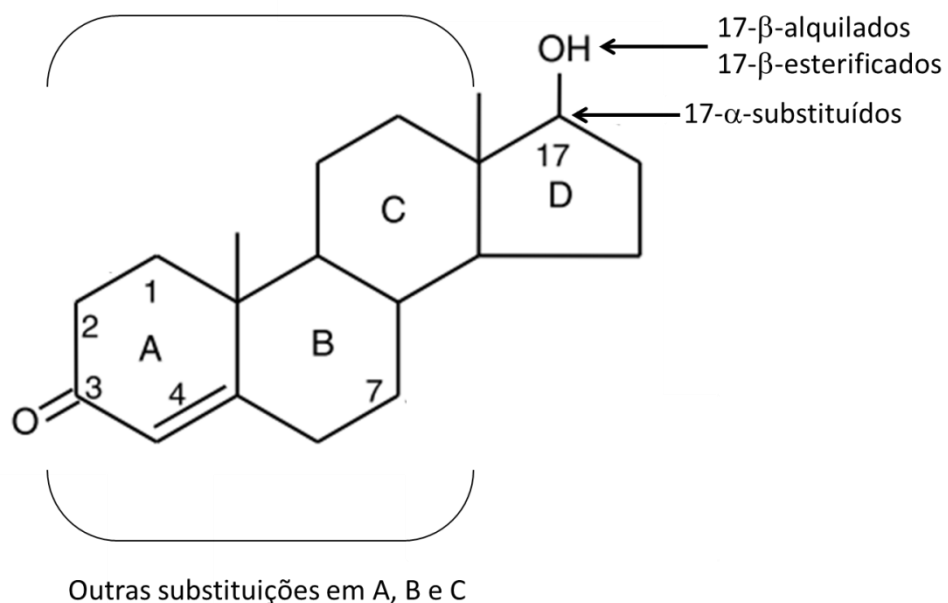


Figura 3: Síntese das diferentes modificações estruturais realizada na molécula da testosterona e que culminaram na síntese dos esteroides anabólicos androgênicos. As setas indicam os locais onde foram realizadas as principais modificações estruturais, Anéis A, B e C, e Carbono 17 (C17) do anel D. Adaptado de Kicman, 2008 e Kuhn, 2002.

Os EAA alkilados no carbono 17- β devem ser administrados via parenteral, mas essa modificação interfere com o tempo de ação, de acordo com o tamanho da

cadeia adicionada. Cadeias carbônicas pequenas (2-3) produzem esteroides com tempo curto de duração e o contrário é observado com cadeias longas (7-10). Esse mesmo tipo de substituição pode ser observado em outra classe de EAA, os C17- β -esterificados, neste último, ocorre à adição de um ácido graxo na posição 17 (Shahidi, 2001).

Outro grupo existente é o dos esteroides com modificações nos anéis A, B e C, os quais promovem diversas alterações farmacológicas nos esteroides, como redução do metabolismo, maior afinidade pelo receptor, resistência à aromatização, entre outros (Kuhn, 2002).

Dentre os EAA, o Decanoato de nandrolona (DN; 19-nor-4-androstene-17 beta-ol-3-ona ou Decanoato de 19-nortestosterona), sintetizado em meados da década de 60 (Van Der Vies, 1965) é um dos EAA mais utilizado e estudado atualmente (Figura 4). Ele é o produto da esterificação do EAA nandrolona com o ácido decanóico e confere a capacidade de aplicação intramuscular e formação de depósito, que é liberado lentamente na circulação, mantendo a concentração de estado estável por 6-7 dias após a administração (Shahidi, 2001). A desmetilação em C19 confere ainda maior afinidade pelos receptores androgênicos, aumentando os efeitos anabólicos desta droga (Celotti & Cesi, 1992).

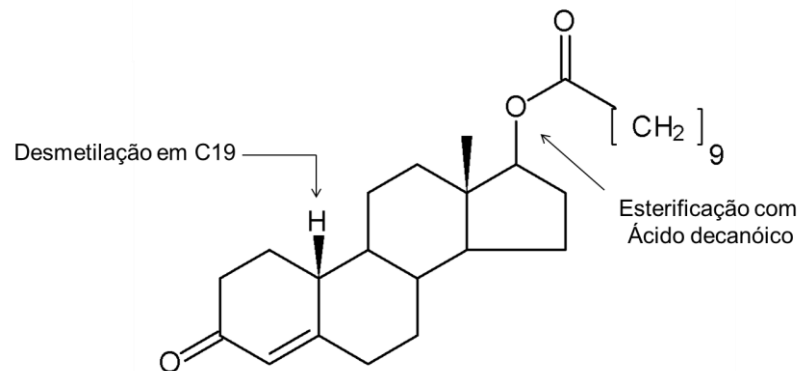


Figura 4: Estrutura química e modificações estruturais na molécula de Decanoato de nandrolona.

O DN pode ser biotransformado pela ação da enzima 5- α -redutase, entretanto, de maneira oposta ao que ocorre com a testosterona o metabólito produzido, dihidronandrolona (DHN), é menos potente que a nandrolona. A explicação para esse fato pode ser a ausência da dupla ligação no anel A e a desmetilação em C19. Segundo Toth & Zakár (1982), essas duas modificações são cruciais para a afinidade ao receptor androgênico e, desse modo, a retirada após a redução com a enzima 5- α -redutase confere a redução na atividade. Com relação à possibilidade deste esteroide ser aromatizável, a literatura apresenta-se controversa, Shahidi, (2001) em revisão sistemática descreve que este esteroide é aromatizável, entretanto outros autores (Bordbar et al., 2014; Kuhn, 2002; Hobbs, Jones & Plymate, 1996;) afirmam o contrário.

O DN, assim como outros EAA, é indicado clinicamente no tratamento de hipogonadismo em homens, perda de massa muscular em pacientes acamados, tratamento de disfunções de crescimento, caquexia decorrente de falência renal crônica, câncer, HIV, entre outros (Basaria, Wahlstrom & Bobs, 2001). Entretanto, devido às ações anabólicas observadas, como aumento de ganho de massa muscular e força, o uso indevido por atletas amadores (Angoorani & Halabchi, 2015;

Solavic et al., 2015) e profissionais (Hartgens & Kuipers, 2004), homens (Darke, Torok & Duflou, 2014) e mulheres (Onakomaiya & Henderson, 2016; Malarkey et al., 1991) vem crescendo nas últimas décadas.

A utilização em doses terapêuticas reduz a possibilidade de efeitos adversos (Van Der Vies, 1985), entretanto, as doses usadas por pessoas que procuram melhoria na estética e na performance, são maiores que a dose terapêutica recomendada (Lippi, Franchini & Banfi, 2011; Sullivan et al., 1998), sem preocupação com os possíveis efeitos adversos a médio e longo prazo.

Vários efeitos adversos foram reportados para os EAA, especialmente para o DN em fêmeas. O uso de DN em fêmeas promove alteração na capacidade reprodutiva, como reportado por Far et al., (2007), que demonstram que fêmeas tratadas com DN 15 mg/kg por duas semanas, apresentaram alteração no ciclo estral e supressão da capacidade reprodutiva, tornando-as inférteis durante o estudo.

Belardin et al., (2014) em estudo recente, demonstra que a utilização de altas doses de DN (15 mg/kg) por 30 dias, promove mudanças no ciclo estral das ratas mesmo após 60 dias de interrupção. Esse achado pode ser associado ao tempo de meia-vida elevado dessa droga, de aproximadamente 130h, e ao acúmulo referente à mecânica enzimática de eliminação, gerando um acúmulo no organismo (Van Der Vies, 1985).

Adicionalmente, o DN é capaz de alterar a histologia ovariana e uterina. No ovário, houve destruição dos folículos e ausência do corpo lúteo, e no útero houve vacuolização do epitélio e fibrose das células do estroma endometrial. Adicionalmente, esses animais apresentaram interrupção no ciclo estral, sendo associado os resultados obtidos ao mecanismo de *feedback* negativo no eixo

hipotálamo-hipófise-gônadas, o que colabora para a estagnação observada (Gerez, Frei & Camargo 2005).

Além das alterações promovidas no sistema reprodutivo, mudanças no sistema nervoso central (SNC) são atribuídas ao uso de EAA. Em recente revisão sistemática, Busardò et al., (2015) descrevem que o DN é capaz de promover alterações moleculares no SNC, em regiões específicas, responsáveis por modular ansiedade e depressão como o hipocampo e a amígdala.

Outras vias neurotransmissoras são alteradas pelo uso de EAA como a dopamina, serotonina e glutamato, sejam elas por modificações diretas na neuromodulação, ou por influências indiretas como mudanças na expressão dos receptores para esses neurotransmissores e outros como o ácido gama-amino-butírico (GABA) e o receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico/aspartato (NMDAR) por ação dos receptores androgênicos (Busardò et al., 2015). Esses efeitos neurológicos podem ser observados em indivíduos adultos (Zotti et al., 2014) e jovens (Lumia & McGinnis, 2010), e tendem a ser mantidos mesmo após a interrupção da utilização (Rainer et al., 2014).

Adicionalmente aos efeitos comportamentais observados pelo uso dos EAA, os efeitos deletérios atribuídos ao uso dessas drogas 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.

Recentemente, Frankenfeld et al. (2014) estudaram a influência do tratamento com DN sobre o estresse oxidativo em tecidos alvo, como fígado, rim e coração. Foi observado aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO) no rim, caracterizado

por redução na atividade da enzima catalase e de outros marcadores como o conteúdo de tiol e de proteínas carbonil, demonstrando o impacto negativo do uso dessa droga em animais.

Outros efeitos deletérios sobre o rim foram relatados na literatura. Pozzi et al., (2013) observaram dano genético no rim dos animais tratados com altas doses de DN (15 mg/kg) por meio do teste cometa. Adicionalmente, Hoseini et al. (2009) demonstraram aumento no peso renal e no volume do rim e do córtex renal nos animais tratados com DN. Esse resultado pode ser atribuído à presença de receptores androgênicos no tecido renal, que viabilizam a hipertrofia e hiperplasia dessas células (Gelmann, 2002; Chang et al., 1995).

De maneira mais completa, Riezzo et al., (2014) evidenciaram que a alta dose empregada de DN (10 mg/kg/semana) influencia nas lesões renais observadas. Utilizando diferentes doses de DN foi possível observar que os animais tratados com a maior dose apresentaram colapso da ultraestrutura glomerular, além de aumento nas citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a Interleucina 1-beta (IL-1 β). O tratamento promoveu aumento da proteína de choque térmico 90 (HSP90), que associado ao resultado positivo no teste de túnel indica apoptose tecidual. Os grupos que receberam a menor dose (3,75 mg/kg/semana) apresentaram alterações estruturais menos graves. 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.

Os efeitos cardiovasculares associados ao uso de DN e outros EAA já foram reportados em humanos e animais (Busardò et al., 2015; Frankenfeld et al., 2014; Kalinine et al., 2014; Hartgens & Kuipers, 2004). A principal causa de morte entre indivíduos que fazem uso abusivo de esteroides é a morte súbita (Montisci et al.,

2012; Thiblin, Mobini-Far & Frisk, 2009; Stergiopoulos et al., 2008), e isso se dá especialmente pelos efeitos cardiovasculares dessa droga.

O DN demonstrou ser capaz de alterar a função sistólica e diastólica, independentemente da associação com o exercício físico (Tanno et al., 2011), o que é preocupante, pois pode provocar arritmias graves nos usuários de EAA.

Os EAA têm como principal característica a ação anabólica, ou seja, o balanço positivo de nitrogênio no organismo que promove aumento da massa muscular (Kicman, 2008). Essa hipertrofia muscular também é observada nos cardiomiócitos, e é descrita como uma doença associada ao aumento da deposição de colágeno cardíaco (Franquni et al., 2013; Andrade et al., 2008), prejuízo na contração muscular (Tanno et al., 2011; Neves et al., 2003) e em reflexos cardiovasculares (Bissoli et al., 2009) e é denominada como hipertrofia cardíaca patológica.

A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como concêntrica, que se caracteriza por uma redução no espaço ventricular esquerdo e ocorre uma adição de sarcômeros em paralelo, de modo que há um espessamento da parede ventricular. E pode ser excêntrica, caracterizada pelo aumento da câmara cardíaca e adição de sarcômeros transversalmente na fibra, favorecendo o aumento do diâmetro da câmara (Mihl, Dassen & Kuipers, 2008).

Hipertrofia concêntrica associada ao uso de DN já foi reportada anteriormente por Tanno et al., (2011) e Nascimento et al., (2015), onde seus resultados em conjunto com o aumento da deposição de colágeno, também reportada por esse e outros autores (Franquni et al., 2013; Andrade et al., 2011), demonstram que o DN promove hipertrofia cardíaca patológica nos animais. A classificação como patológica não se dá apenas pela classificação como concêntrica, mas

principalmente pela deposição de colágeno e alterações na funcionalidade do tecido cardíaco (Fernandes, Soci & Oliveira, 2011).

Ademais, a participação do sistema renina angiotensina (SRA) parece ser importante para os efeitos deletérios associados ao uso de DN. Andrade et al., (2011) observaram que a utilização de enalapril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), foi capaz de prevenir os prejuízos promovidos pelo uso de DN, demonstrando assim, a importância desse sistema. Resultado semelhante foi descrito por Marques-Neto et al., (2014) utilizando bloqueador de receptor AT1 e de receptor de mineralocorticoide, verificando que o bloqueio do SRA evita os efeitos deletérios provocado por DN, mantendo a cardioproteção promovida pelo exercício físico.

Outrossim, o DN ainda pode promover alterações no sistema nervoso autônomo, aumentando o tônus autonômico simpático e receptores β -adrenérgicos distribuídos no tecido cardíaco, intensificando assim a possibilidade de eventos adversos cardiovasculares (Hassan & Kamal, 2013; Neves et al., 2013; Riezzo et al., 2011).

Esses fatores descritos anteriormente podem contribuir para o aumento na pressão arterial média, que já foi reportado anteriormente em estudos experimentais realizados com dose elevada de DN (Neves et al., 2013; Andrade et al., 2011; Tanno et al., 2011; Bissoli et al., 2009). Esse aumento parece estar relacionado ao tempo e a dose utilizada para tratamento, sendo observado desenvolvimento da hipertensão na dose de 20 mg/kg/semana por 4 semanas (Franqui et al., 2013), enquanto dose de 10 mg/kg/semana por 4 semanas não altera a pressão (Andrade et al., 2008) e a mesma dose por oito semanas induz elevação da pressão, porém sem atingir níveis de hipertensão (Andrade et al., 2011; Bissoli et al., 2009). Ressalta-se, também, que

a dose de 20 mg/kg/semana foi capaz de induzir hipertensão, mesmo em animais submetidos a exercício físico (Lima et al., 2015).

A pressão arterial é controlada por sistemas humorais e autônomos. Os reflexos cardiovasculares controlam a pressão em curto prazo, promovendo aumento ou redução da pressão arterial conforme necessário, e a ativação se dá pelo acionamento de receptores específicos, sendo os principais reflexos cardiovasculares o baroreflexo, o quimiorreflexo e os reflexos cardiopulmonares (Shepherd & Mancia, 1986).

A redução na sensibilidade desses reflexos pode ser correlacionada com o desenvolvimento de hipertensão (Chapleau, Hajduczuk & Abboud, 1988). Foi reportada influência negativa do uso de EAA sobre os reflexos cardiovasculares, em estudo de Beutel, Bergamaschi & Campos (2005), onde foi utilizado o EAA stanazolol, demonstrando redução na sensibilidade do componente bradicárdico do barorreflexo. Bissoli et al., (2009) observaram pela primeira vez que o uso de altas doses de DN cronicamente (8 semanas), promove redução na sensibilidade do Reflexo Bezold-Jarisch (RBJ), o que foi posteriormente confirmado por Andrade et al., (2011) e por outros estudos usando dose maior, porém com menor tempo de exposição, 4 semanas (Lima et al., 2015; Franquni et al., 2013).

O RBJ é um reflexo ativado quimicamente, e conhecido desde meados do século XVIII quando Von Bezold e Hirt observaram bradicardia, hipotensão e apinéia após a administração dos alcalóides *veratrum*. Em 1939, Jarisch e Richter caracterizaram esse reflexo, propondo a localização dos receptores e indicando que a aferência seria vagal e a eferência era feita por ativação parassimpática. Somente em 1961 o reflexo foi denominado pela primeira vez “Reflexo Bezold-Jarisch” em homenagem aos seus descobridores (Krayner, 1961).

A ativação desse reflexo se dá pelo acionamento das fibras aferentes vagais quimiosensíveis, promovendo redução na pressão arterial, frequência e débito cardíaco. Essas respostas são mediadas por receptores de serotonina (5-HT₃), e podem ser estimulados farmacologicamente pela fenilbiguanida, nicotina, prostaglandinas e bradicinina. A informação captada pelos receptores é enviada ao Núcleo do Trato Solitário (NTS), que é a primeira região integradora bulbar. Após uma complexa rede integradora neuronal, há o envio de informações aos neurônios que controlam a atividade eferente simpática para as artérias de resistência e coração e que se originam primariamente na Medula Ventro Lateral Rostral (RVLM), de acordo com a informação recebida, essa região pode ser inibida ou estimulada, de acordo com a necessidade (Koshiya et al., 1993).

A importância fisiológica do RBJ parece estar relacionada com a isquemia miocárdica. Entretanto, seu papel parece ser importante em outros quadros fisiopatológicos. A literatura descreve que o reflexo se apresenta prejudicado em pacientes com hipertensão associada à hipertrofia cardíaca (Mark & Kerber, 1992; Zanchetti & Mancia, 1991), e a hipertrofia cardíaca parece ser um ponto chave para o desenvolvimento do prejuízo na sensibilidade do RBJ (Bissoli *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2008; Flanagan *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2007; Uggere *et al.*, 2000).

1.2.3 Peptídeo Natriurético Atrial

Os primeiros relatos de que o coração poderia funcionar como órgão endócrino surgiram na década de 50 após ter sido reportada a presença de grânulos secretórios no átrio de coração de porco, e sua influência no controle da diurese e da importância do átrio nesse processo (Henry et al., 1956; Kisch, 1956).

Na década de 80, De Bold e colaboradores (1981) demonstraram que a aplicação do homogenato do átrio de rato, era capaz de promover aumento na

excreção de sódio, cloreto e potássio, bem como aumentar o volume urinário produzido por esses animais. Adicionalmente, a redução na pressão arterial também foi observada, comprovando assim, que o átrio produzia uma substância, até então desconhecida, e que esta tinha ação direta no rim.

As pesquisas nessa área se intensificaram, culminando na identificação de 3 peptídeos com estruturas químicas semelhantes, o Peptídeo natriurético atrial (ANP), o Peptídeo natriurético tipo B (BNP) também conhecido como peptídeo natriurético cerebral, e o peptídeo natriurético tipo C (CNP) (Figura 5; Nakao et al., 1990; Sudoh et al., 1990; Sudoh et al., 1988; Misono et al., 1984)

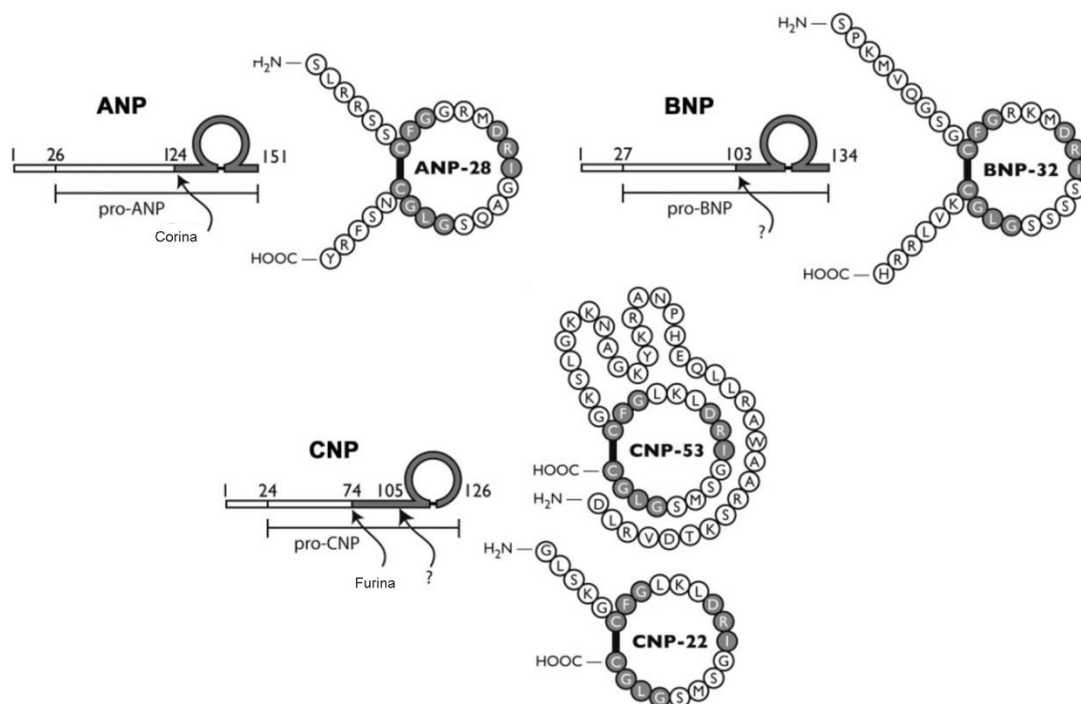


Figura 5: Estrutura molecular do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Peptídeo Natriurético tipo B (BNP) e Peptídeo Natriurético tipo C (CNP). Na figura é possível observar as etapas de clivagem do peptídeos, de pró-hormônio à hormônio. Adaptado de Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006.

A síntese dos peptídeos se dá na forma de pré-pró-hormônio. O ANP inicialmente possui 151 resíduos de aminoácido, e tem a região N-terminal clivada e

originando um pró-hormônio com 126 resíduos. Este é armazenado nos grânulos atriais, e quando ocorre o estímulo, o pró-hormônio é clivado por uma protease chamada corina, originando o hormônio ANP, que é liberado para a circulação (Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006).

Os três peptídeos acionam três receptores, com graus de afinidade diferentes (Figura 6). Os receptores A e B de peptídeo natriurético (NPRA/NPRB) também conhecido como guanilciclase A e B ou receptor de peptídeo natriurético 1 e 2 (NPR1/NPR2) são receptores acoplados à proteína G e atuam por meio do aumento de monofosfato de guanidina cíclico (GMPc), que é o segundo mensageiro responsável pelos efeitos fisiológicos dos peptídeos. O receptor tipo C (NPRC) é conhecido como o receptor de *clearance*, ou seja, responsável pela internalização do peptídeo e consequente redução das suas ações (Potter, 2011; Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006).

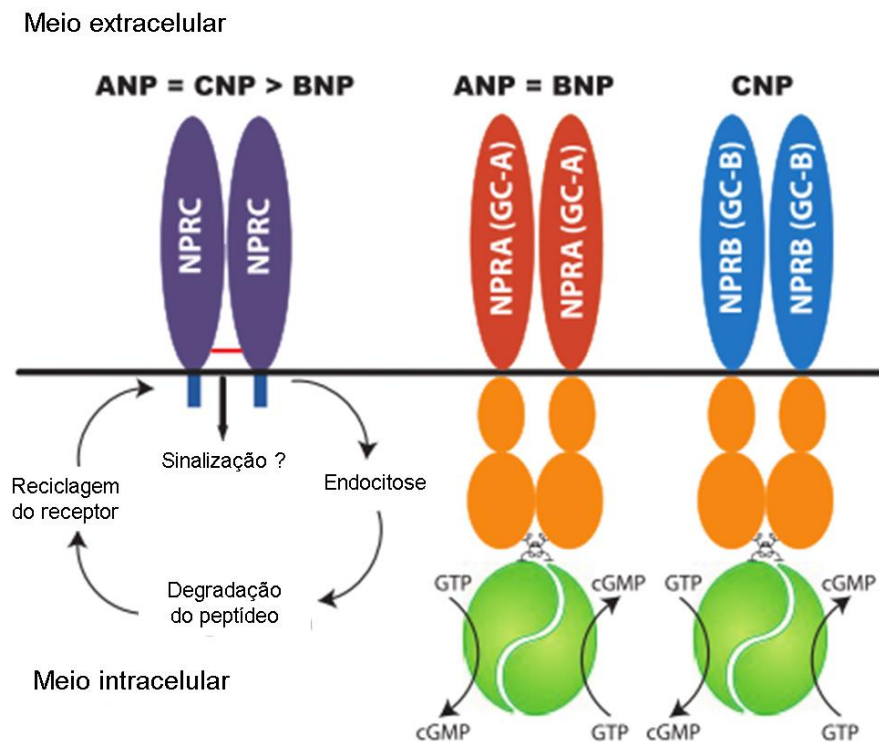


Figura 6: Afinidades dos peptídeos natriuréticos pelos receptores A, B e C, bem como suas principais vias de sinalização intracelular. Adaptado de Potter, 2011.

Após ligar-se ao seu principal receptor (NPR-A), o ANP promove, principalmente, aumento da concentração intracelular de GMPc. Esse segundo mensageiro, por sua vez, interage com outras vias de sinalização, como as proteínas quinases (PK), as fosfodiesterases (PDE's) e os canais iônicos que se abrem por nucleotídeos cíclicos, promovendo diferentes respostas em cada órgão alvo especificamente (Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006).

De modo geral, o principal estímulo para a liberação do ANP é físico e promovido pela distensão das paredes atriais, especialmente pelo aumento do retorno venoso. Entretanto, doenças como hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca também são capazes de promover aumento na liberação de ANP (Dietz, 2005). Adicionalmente, o exercício físico pode promover a sua liberação. Endlich et al., (2011) demonstraram a participação do ANP na redução da pressão arterial em SHR promovida por exercício físico, entretanto, essa participação só ocorreu nos animais que fizeram natação e não nos que praticaram corrida, isso demonstra que em exercícios onde há imersão o ANP é liberado, o que pode colaborar para a redução da pressão arterial em indivíduos hipertensos.

A liberação do ANP é controlada, no contexto fisiológico, por sistemas existentes naturalmente no organismo como SRA. Lachance & Garcia (1988) demonstraram a relação entre a Angiotensina II e a liberação de ANP, entretanto, o aumento no ANP plasmático só foi significativo nos animais onde houve aumento da pressão arterial média, sugerindo que o aumento da liberação de ANP está relacionado com as mudanças hemodinâmicas promovidas pela Angiotensina II (ANG II), e não por ação direta desse peptídeo.

Outros estudos demonstraram que o ANP é capaz de contrabalancear os efeitos do SRA, ou seja, o aumento da liberação do ANP promoveria queda na liberação de renina pelas células justaglomerulares, e essas mudanças fisiológicas em conjunto, promoveriam a redução na pressão arterial dos indivíduos (Schweda & Kurtz, 2009; Kurtz et al., 1986).

No rim, principal órgão-alvo do ANP, a ligação desse peptídeo ao receptor A (NPR-A), promove aumento da taxa de filtração glomerular e inibe a reabsorção de água e sódio, estas modificações ocorrem pelo menos em parte por meio do aumento da pressão no capilar glomerular. Nos túbulos proximais, o ANP inibe o transporte de sódio e água promovido pela Angiotensina II, enquanto nos túbulos coletores, inibe canais de sódio epiteliais. Essas ações promovem maior excreção de sódio e água (Light, Corbin & Stanton, 1990; Harris, Thomas & Morgan, 1987; Marín-Gerez, Fleming & Steinhausen, 1986).

Outra influência importante do ANP é sua relação com o remodelamento cardíaco. Em estudos realizados com animais *knockout* para ANP ou NPR-A, foram observados hipertrofia cardíaca e desenvolvimento de hipertensão, sugerindo, assim, que esse peptídeo atua como um fator intrínseco local, inibindo a proliferação exacerbada dos cardiomiócitos, e, conseqüentemente, inibindo o processo de hipertrofia cardíaca local (Revisado por Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006).

Estudo de Romero et al., (2013) demonstrou que a infusão, por 14 dias, de ANP (100 ng/h) em animais SHR de ambos os sexos, promoveu redução na pressão e diminuição do remodelamento cardíaco, caracterizado por decréscimo no tamanho dos cardiomiócitos e da deposição de colágeno no tecido cardíaco. Outrossim, em estudo recente de Moubarak et al., (2015), evidenciou-se a importância do ANP e seus receptores em culturas de fibroblastos cardíacos, onde o tratamento com ANP

foi capaz de reduzir a deposição de colágeno nessas células, indicando a sua ação antifibrótica.

De modo oposto, o SRA cardíaco está correlacionado de maneira positiva com o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose cardíaca, conforme já demonstrado por diversos autores (Andrade et al., 2011; Piratello et al., 2010; Santos & Sampaio, 2010; Barauna et al., 2008). Assim, pode-se inferir que os dois sistemas podem ter ações antagônicas e compensatórias, especialmente no tocante ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e remodelamento.

Estudos demonstram que o DN é capaz de promover diversos efeitos deletérios cardiovasculares, como remodelamento cardíaco (Franquni et al., 2013), aumento de pressão arterial (Bissoli et al., 2009) e alteração na eletrofisiologia cardíaca (Neves et al., 2013), entretanto não foi reportado na literatura a correlação entre o ANP e a associação de exercício e DN em fêmeas.

1.2.4 Exercício físico

O exercício físico periódico é responsável por promover inúmeros benefícios à saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstra que o sedentarismo é um fator de risco importante para mortalidade no mundo (6%), causada principalmente por doenças não transmissíveis, como hipertensão (13%) e diabetes (5%) (WHO, 2010).

Segundo documento publicado pela OMS, a prática de exercício físico moderado-intenso, por pelo menos 150 minutos por semana, pode promover efeitos benéficos no sistema cardiovascular, reduzindo a chance de desenvolvimento de diabetes e síndrome metabólica nesses indivíduos (WHO, 2010).

Tem sido reportado que o exercício físico é uma importante ferramenta não-farmacológica na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Rodrigues

et al., 2014; Mann & Rosenzweig, 2012). A cardioproteção promovida pelo exercício, frequentemente tem sido implicada com as adaptações estruturais e hemodinâmicas no sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca fisiológica (Ellison et al., 2012; Weiner & Baggish, 2012), bradicardia de repouso (Hassan & Kamal, 2013; Smith et al., 1989), melhora do controle autonômico (Rodrigues et al., 2014), redução na pressão arterial (Moraes et al., 2012a, Moraes et al., 2012b) e melhora no perfil inflamatório (Rodrigues et al., 2014; Ribeiro et al., 2012).

Além disso, a atividade física é eficaz na redução do índice de massa corporal e tecido adiposo (Thompson et al., 2012), assim como, melhora no perfil de colesterol, efeitos benéficos no remodelamento ósseo (Banfi et al., 2012), na sensibilidade à insulina e aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético (Ikeda et al., 2016; Ivy, 1997).

O exercício físico pode ser classificado em dois tipos básicos, de acordo com o grau de movimentação realizado pelo indivíduo que o pratica, em exercícios estáticos ou isométricos e exercícios dinâmicos ou isotônicos. Nos exercícios estáticos ou isométricos há pouca ou nenhuma movimentação corporal, sendo caracterizado por aumento de sobrecarga pressórica sobre o coração, e tem como exemplos principais o levantamento de peso e a musculação. Esse tipo de exercício também é conhecido como resistido. Por sua vez, os exercícios descritos como dinâmicos ou isotônicos são caracterizados por movimentação intensa do indivíduo e promovem no coração sobrecarga de volume e aumento da frequência cardíaca. Os exemplos desse tipo de exercício são a corrida e natação (Revisado por Fernandes, Soci & Oliveira, 2011).

As modificações hemodinâmicas promovidas pelo exercício físico causam mudanças estruturais cardíacas, dentre elas a hipertrofia cardíaca fisiológica e

adaptativa é a mais comum. A hipertrofia pode ser classificada como concêntrica ou excêntrica, a diferenciação ocorre devido a vários fatores. Na hipertrofia concêntrica ocorre o aumento do cardiomiócito na transversal por meio da adição de sarcômeros em paralelo, além disso, o espaço da câmara cardíaca fica reduzido. Na hipertrofia excêntrica há o aumento do cardiomiócito em sentido longitudinal, e os sarcômeros são adicionados lado a lado, isso promove aumento da câmara cardíaca. Nesse tipo de hipertrofia, promovido pelo exercício físico não há prejuízo na função cardíaca, tão pouco deposição de colágeno tecidual (Revisado por Fernandes, Soci & Oliveira, 2011).

Entretanto, é importante ressaltar que a hipertrofia promovida pelo exercício físico é tida como fisiológica, e acontece pela adaptação do coração as necessidades corporais, seja por sobrecarga pressórica ou de volume, e difere-se da hipertrofia observada no remodelamento cardíaco, dita como patológica, devido especialmente a deposição de colágeno, desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias e prejuízo na função cardíaca (Revisado por Muhl et al., 2008).

Os indivíduos podem associar o exercício físico com a utilização de drogas, especialmente os EAA, com o intuito de aperfeiçoarem o ganho de massa muscular e os resultados estéticos desejados (Abrahin, Souza & Santos, 2014; Hartgens & Kuipers, 2004).

Em estudos experimentais prévios, já foi demonstrada a associação negativa existente entre exercício físico resistido e utilização de doses abusivas de DN. Cunha et al., (2005) demonstraram que o tratamento com DN é capaz de reverter o benefício do exercício físico sobre a reatividade vascular de anéis de aorta. Além disso, Tanno et al., (2011) observaram que tanto o exercício resistido quanto o tratamento com DN foram capazes de promover hipertrofia cardíaca. Entretanto, no

grupo submetido apenas ao exercício resistido não houve deposição de colágeno e tão pouco desenvolvimento de genes fetais como o ANP, porém, quando exercício foi associado ao tratamento com DN os efeitos deletérios foram observados, como ativação de genes fetais e deposição de colágeno tecidual.

Em outro estudo realizado por Hassan & Kamal, (2013), avaliando o impacto do exercício físico resistido e tratamento com doses de abuso de DN sobre a hemodinâmica e apoptose em tecido cardíaco foi possível observar, prejuízo na angiogênese, aumento de Caspase-3 e consequente apoptose, e hipertrofia cardíaca patológica nesses animais, além de maior atividade do nervo renal e aumento da frequência cardíaca, indicando aumento do risco cardiovascular nesses animais.

Adicionalmente, Neves et al., (2013) demonstraram que o DN é capaz de aumentar a expressão de receptores β -adrenérgicos (1 e 2) no átrio dos animais tratados com dose de abuso de DN, além de ser capaz de alterar o intervalo QTc do eletrocardiograma. Esses resultados demonstram uma tendência ao desenvolvimento de arritmias malignas, que podem evoluir para morte súbita nos indivíduos exercitados e que fazem uso DN.

Corroborando os dados publicados previamente, em revisão sistemática Frati et al., (2015) identificou 19 casos de morte súbita, entre 1990 e 2012, em indivíduos com alguma correlação de uso abusivo de EAA. Desses casos, 12 tiveram resultado positivo no exame toxicológico para o uso de substâncias anabolizantes, e desse total, por volta da metade de casos foi detectado o uso de DN, demonstrando assim, a correlação e o perigo do uso deste EAA em casos de morte súbita em humanos.

Dados do nosso grupo demonstram que a associação do exercício físico resistido não retarda os efeitos negativos do tratamento com DN. Franconi et al.,

(2013) demonstrou que o tratamento com 20 mg/kg/semana durante 4 semanas promove desenvolvimento de hipertensão e prejuízo no RBJ, além disso há a deposição de colágeno e desbalanço em citocinas pró e anti-inflamatórias. Utilizando dose semelhante, Lima et al., (2015) demonstraram que o exercício físico não modifica esse padrão de respostas, logo é possível inferir que os efeitos benéficos do exercício não sobressaem às ações negativas do DN.

Apesar dos resultados amplos a respeito dos efeitos fisiopatológicos do tratamento com DN em animais experimentais, a literatura falha no fornecimento de informações a respeito das ações em indivíduos do sexo feminino, mesmo havendo um aumento da utilização desse tipo de drogas pelas mulheres (Onakomaiya & Henderson, 2016), tão pouco se sabe do papel do peptídeo natriurético atrial nas ações dessas drogas, sendo necessário ampliar os estudos nesse sentido.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com DN durante o treinamento resistido na expressão do ANP e do RBJ em ratas e verificar o papel do estrogênio nesses parâmetros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a influência do tratamento crônico com alta dose de Decanoato de nandrolona sobre o sistema cardiovascular de ratas jovens, submetidas ou não a atividade física resistida e o impacto da redução de estrogênio nesse processo.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar o tratamento com Decanoato de nandrolona e/ou exercício físico resistido sobre:

- ✓ Pressão arterial média;
- ✓ Reflexo bezold-jarisch;
- ✓ Padrão de excreção renal;
- ✓ Hipertrofia e fibrose cardíaca e renal;
- ✓ Análises bioquímicas de ureia e creatinina no soro;
- ✓ Expressão de ANP, receptor A e C nos tecidos atrial e renal, respectivamente.
- ✓ Verificar se a ovariectomia influencia nos parâmetros estudados;

3 MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas, com peso inicial entre 180-200g e idade de aproximadamente dois meses. Os animais foram recebidos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, com umidade e temperatura (22°C) controlada, e ciclo claro-escuro de 12h. Os animais tiveram acesso à água e comida (Purina Labina, SP-Brazil) *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA; BRASIL, 2013) e aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal da UFES (CEUA-UFES: 031/2012).

Os animais foram separados em 8 grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento ao qual foram submetidos, todos os animais do grupo S foram submetidos a cirurgia fictícia (Sham):

- ✓ S e OVX (n=8 cada), animais tratados com veículo, óleo de amendoim (intramuscular, I.M.) duas vezes por semana, e não submetidos a exercício físico;
- ✓ SE e OVXE (n=8 cada), animais tratados com o veículo e submetidos ao protocolo de exercício resistido (ER), 5 vezes por semana;
- ✓ SD e OVXD (n=8 cada), animais tratados com Decanoato de nandrolona (DN; Deca Durabolin[®], Organon, São Paulo) na dose de 20 mg/kg por semana (I.M.) divididos em duas aplicações por semana, não submetidos a exercício físico resistido;

- ✓ SDE e OVXDE (n=8 cada), animais tratados com DN e submetidos ao exercício físico resistido. Todos os protocolos de tratamento foram mantidos por 4 semanas. Os experimentos foram realizados em prazo máximo de 5 dias após a última dose de DN.

3.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100 e 10 mg/kg, intraperitoneal; I.P), tiveram a região dos flancos tricotomizadas e assepsiadas com álcool 70° GL, o animal foi mantido em decúbito lateral e uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita na pele e na musculatura abdominal, com o intuito de exteriorizar os ovários. Após a exteriorização, os ovários e as trompas foram amarrados com o auxílio de uma linha reabsorvível, e removidos. A pele e a musculatura foram então suturadas, a região foi limpa e o procedimento foi repetido no outro lado.

Os animais submetidos à cirurgia fictícia tiveram uma incisão feita na pele e musculatura, com posterior exposição dos ovários, os mesmos foram então reintroduzidos no abdômen, seguido da sutura e limpeza da região.

3.3 Exercício físico resistido

O protocolo de exercício físico resistido foi realizado de acordo com o descrito por Voltarelli, Gobarro & Mello (2002), com modificações. De maneira resumida, uma semana antes do início do protocolo experimental, os animais foram adaptados ao meio líquido, sendo mantidos em um recipiente cilíndrico com água aquecida ($31^{\circ} \text{C} \pm 1$), por 60 minutos sem, entretanto, serem submergidos. Após a adaptação, iniciou-se o protocolo de treinamento que consistia em 6 sessões de saltos, com plaquetas de chumbo acoplado ao tórax do animal, equivalente a 40% da massa corporal,

onde esses eram incentivados a saltar em um recipiente com água pré-aquecida ($31^{\circ} \text{C} \pm 1$), contendo 3 vezes sua altura, por 30' seguidos de 30' de descanso. Após esse treino, os animais foram mantidos em descanso por 9 minutos e retornaram ao exercício físico com carga reduzida (30% da massa corpórea), durante 8 sessões de 60' treinando, seguido de 30' de descanso, com contagem de saltos por minutos durante todas as sessões. Ao final do procedimento, foram retirados 20 μL de sangue da ponta da calda dos animais para dosagem de lactato sanguíneo medido com o auxílio de um lactímetro. O exercício físico resistido foi realizado 5 vezes por semana durante 4 semanas (Cunha et al., 2005).

3.4 Avaliação do ciclo estral pelo esfregaço vaginal

Os animais foram submetidos à avaliação do ciclo estral para verificar a ciclicidade normal e fase das ratas, antes da realização dos experimentos (Marcondes, Bianchi & Tanno, 2002). Para este procedimento, 20 μL de solução salina (NaCl 0,9%) foram introduzidas gentilmente na cavidade vaginal das ratas com o auxílio de uma micropipeta, e realizados movimentos circulares suaves para retirada do conteúdo vaginal, que em seguida, foi aplicado a uma lâmina de vidro junto a uma gota de solução de lugol, sendo posteriormente analisado em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) (Vilela, Santos Junior & Silva, 2007).

A determinação do ciclo foi realizada por meio da observação da presença e predominância de células nucleadas, escamosas e leucócitos, e classificadas em estro, diestro I, diestro II e proestro. Estro: queda da produção estrogênica e, na análise da citologia observa-se apenas células escamosas; Diestro I, também chamado de metaestro: quando se observa presença de células nucleadas, escamosas e

leucócitos em igual quantidade; Diestro II: com presença de células nucleadas e leucócitos à observação microscópica; Proestro: auge da produção estrogênica, quando apenas células nucleadas são vistas na análise microscópica (Marcondes et al., 2002).

Uma semana antes da data do procedimento experimental, as ratas tiveram o ciclo estral acompanhado, e o experimento só foi realizado quando as ratas do grupo S e SE se encontravam em proestro.

3.5 Coleta e análises urinárias

Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas, para a coleta e medição do volume urinário de 24h, com acesso a água (60 mL) e comida por 48h. No primeiro dia o volume foi medido e descartado, somente nas últimas 24h que o volume urinário foi medido e armazenado (-80° C) para as posteriores análises de sódio urinário.

Para esta dosagem, uma alíquota é diluída na proporção 1:100 de água ultra pura (Milli-Q), e aplicada em um fotômetro de chama (Micronal apparatus, modelo B, São Paulo, SP, Brasil). A quantidade de sódio excretada é representada por mEq-Na/mL de urina.

3.6 Avaliação da pressão arterial média e Reflexo Bezold-Jarisch

Posteriormente, a um intervalo de 24h da retirada dos animais da gaiola metabólica, procedeu-se a cateterização da artéria e veia femorais. Brevemente, os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100/10 mg/kg; I.P.) e uma incisão na região inguinal foi feita, com posterior isolamento do plexo vasculo-nervoso, possibilitando a cateterização da artéria e veia femoral, respectivamente, utilizando cateteres de polietileno (PE10 acoplado à PE50, Clay Adams, USA). Os

cateteres foram mantidos preenchidos com solução salina (NaCL 0,9%) e ocluídas com pinos de aço inoxidável. O cateter arterial femoral esquerdo foi conectado a um transdutor de pressão (Grass Instrument Div., Warwick, NY, USA; Model PT 300) através de um cateter flexível, e os valores de registro da pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) foram obtidos através de um sistema computadorizado e um programa para aquisição de dados biológicos (Biopac System[®]; MP100, Santa Barbara, CA, USA), 24h após o procedimento de cateterização (Franquni et al., 2013).

Em seguida, realizou-se a avaliação do reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Para isto, doses randomizadas de Fenilbiguanida (FBG; 1,5-24 µg/kg) foram aplicados *in bolus* nos animais, sendo observado como resposta da ativação deste reflexo, bradicardia e hipotensão. O grau de sensibilidade do reflexo foi medido por meio do percentual máximo de queda da Pressão Arterial Diastólica (PAD) e FC após cada dose de FBG (Franquni et al., 2013).

3.7 Retirada dos tecidos e análises histológicas

Após a avaliação do RBJ, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi recolhido e a cavidade torácica exposta, onde foi possível exteriorizar o coração e posteriormente realizar a separação do átrio direito (AD) e dos ventrículos.

Os animais tiveram o coração lavado em solução salina, foram secos e pesados. O AD foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido para as análises posteriores de real time PCR (RT-PCR), e os ventrículos foram armazenados em solução de formol (10%) tamponado para as análises histológicas. A relação massa do coração úmido pelo comprimento da tíbia (Cor/Tíbia) foi utilizada como indicativo de hipertrofia macroscópica e foi confirmada pelas análises morfométricas.

Os rins dos animais foram retirados, lavado com solução salina, seco com papel de filtro, e posteriormente pesado para a obtenção dos dados de hipertrofia renal. Um dos órgãos foi então armazenado em solução de formol a 10% tamponado, para posterior análise histológica, enquanto o outro foi congelado em nitrogênio para a realização das análises de RT-PCR.

Após 24h na solução de formol, os tecidos cardíaco e renal foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo manual rotativo (LEICA), com espessura de 5 μm .

Os corações foram corados com hematoxilina/eosina (H&E), para avaliação de hipertrofia cardíaca. Outros cortes dos corações e rim (córtex renal) foram corados utilizando Picrosirius red (Sirius Red), a fim de verificar a deposição de colágeno.

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

3.8 Análises bioquímicas

O sangue dos animais, foi levado a centrífuga (3000 rpm, 4^o C, 15 minutos) para a separação do soro e congelado (-80^o C) até o momento do uso. As dosagens de Creatinina e Ureia no soro foram realizadas por meio do uso de Kits Bioquímicos disponíveis no mercado (Bioclin[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) de acordo com as especificações do fabricante.

3.9 Expressão gênica de ANP, NPR-A e C por Real Time PCR (RT-PCR)

O RNAm total foi extraído do átrio e dos rins utilizando um protocolo estabelecido previamente (Haroon et al., 2015). Os tecidos foram processados em tubos tipo eppendorf estéreis com 1mL do reagente TRIzol® e homogeneizado em seguida. Foi adicionado a mistura homogeneizada, 1,0 mL de clorofórmio e o tubo foi levado a centrifugação (12000 g, 4°C por 15 minutos). Após a separação de fases, o sobrenadante foi transferido para um segundo tubo eppendorf, junto com 650 µL de isopropanol, e novamente centrifugado por 35 minutos (12000 g à 4° C). O sobrenadante desta segunda separação foi descartado e 1,3 mL de etanol (75%) foram adicionados ao pellet seguido de nova centrifugação (12000 g, 4°C por 15 minutos). O sobrenadante foi novamente descartado e o RNA recém-extraído foi re-suspenso em 20 µL de água ultrapura livre de RNA e DNA (UltraPure™ DNase, RNase free water; Intrivitrogen Life technologies™, Carlsbad, CA, USA) e mantida a -80° por um dia. Após esse período o RNA foi tratado com a enzima DNase, seguindo as instruções do fabricante (Turbo DNA free™, Ambion Inc. Carlsbad, CA, USA). De maneira breve, em cada amostra foi adicionado 1 µL do reagente de DNase I. As amostras foram então incubadas por 30 minutos à 37° C, e 10% do volume do reagente de inativação foram adicionados, seguido de nova incubação por 2 minutos a temperatura ambiente. Por fim as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 2 minutos com o intuito de separar o sobrenadante.

A expressão gênica do ANP e seus receptores (NPR-A e NPR-C) foram determinados por *Real time* PCR no átrio direito (AD) e o rim esquerdo, respectivamente. Para tanto a síntese do cDNA foi realizada através de transcrição reversa, a partir do RNAm obtido das amostras, como descrito anteriormente. Deste modo, uma mistura contendo os *Randon primers* (100 ng/µL), um mix de trifosfato de

deoxirribonucleotídeo (dNTP; 10 mM) e água ultrapura livre de RNA e DNA (quantidade suficiente para 13 μ L) foram adicionados a 1 μ g of RNA e incubados por 5 minutos a 65°C, seguido por resfriamento de 1 minuto a 4°C. A retrotranscrição foi feita utilizando tampão PARA pcr (5x), dithiothreitol (DTT; 0,1M), inibidor ribonucleico (40 U/ μ L) e enzima de transcrição reversa (Superscript III RT enzyme), após a adição dos reagentes ao tubo eppendorf, seguiu-se o processo e incubação, que consistiu em aquecimento por 5 minutos a 25°C, 50 minutos a 50° C e por fim 15 minutos a 70°C. O cDNA obtido foi então armazenado a -20°C para as análises posteriores. Para a quantificação da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), foi utilizado o gene do ribossomo (26s) como normalizador (Haroon et al., 2015), a reação foi realizada em placas de 96 poços utilizando o agente colorimétrico SYBR® green (LifeTechnologies™). A análise da expressão gênica relativa foi realizada utilizando o método descrito por (Livak & Schmittgen, 2001) ($2^{-\Delta\Delta CT}$), que consiste na comparação entre os diferentes tratamentos com um dos grupos onde os menores valores de expressão nos ciclos limiar (C_T) são encontrados. A programação de ciclos utilizados no termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; ABI-Prism 7000 System) foram as seguintes: Estágio 1, ciclo de 2 minutos a 52°C; Estágio 2, ciclo de 10 minutos a 95°C; Estágio 3, 60 ciclos de 0.15 minutos a 95°C e 1 minuto a 50°C.

Os primers específicos usados foram os seguintes: (ANP: 5'-GGA TTT CAA GAA CCT GCT AGA-3' and 5'-CTT CAT CGG TCT GCT CGC TCA-3'; NPR-A: 5'-ATC ACA GTG AAT CAC CAG GAG TTC-3' and 5'-AGA TGT AGA TAA CTC TGC CCT TTC G-3'; NPR-C: 5'-CCT ACA ATT TCG ACG AGA CCA AA-3' and 5'-ACT CGC TCA CTG CCC TGG ATG TA-3').

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, La Jolla, CA – USA). A comparação entre as médias foi avaliada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para as análises do reflexo Bezold-Jarisch e entre os grupos OVX e S foram utilizadas ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Para os hormônios as diferenças entre as médias foram determinados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Após o período de tratamento com DN pode-se observar aumento na expressão gênica de ANP no átrio direito dos animais (Figura 6, Painéis A e B), e o exercício físico sozinho não promoveu esse incremento, porém ao associar ambos os tratamentos, observa-se aumento na expressão do ANP de magnitude semelhante a do tratamento com DN (S: $1,142 \pm 0,102$; SD: $2,802 \pm 0,488$; SE: $1,000 \pm 0,030$; SDE: $2,962 \pm 0,385$ OVX: $1,213 \pm 0,322$; OVXD: $2,290 \pm 0,578$; OVXE: $1,320 \pm 0,167$, OVXDE: $3,618 \pm 0,478$ RNAm ANP/26s em unidades arbitrárias; ** quando $p < 0,05$ quando comparado ao grupo S; ++ quando $p < 0,01$ em comparação ao grupo OVX). A ovariectomia sozinha não promoveu alteração nesse parâmetro (quando o grupo OVX foi comparado ao grupo S), assim como o tratamento no grupo OVXD, onde foi possível observar apenas tendência a esse aumento sem, entretanto, diferença estatística.

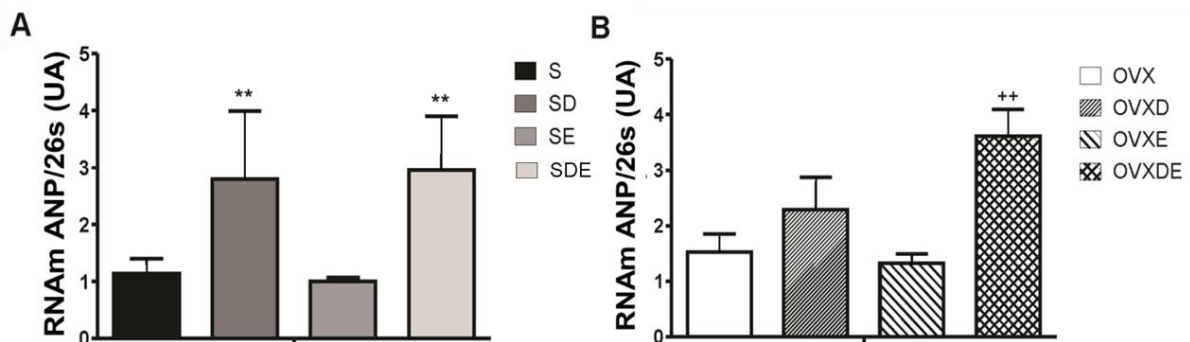


Figura 7: Valores de expressão gênica de ANP no átrio direito de ratas tratadas com DN e/ou submetidas a exercício físico resistido. Painel A: Animais submetidos à cirurgia fictícia (S, SD, SE e SDE). Painel B: Animais submetidos a ovariectomia (OVX, OVXD, OVXE e OVXDE). Todos os tratamentos foram iniciados após 21 dias do procedimento cirúrgico e foram mantidos por 4 semanas.

** $p < 0,01$ quando comparado a S; ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX.

Com relação à expressão gênica dos receptores de ANP no rim, pode-se observar redução na expressão gênica do receptor A após o tratamento com DN (Figura 7, Painel A e B), tanto nos animais treinados quanto nos não treinados (S: $5,908 \pm 0,307$; SD: $1,050 \pm 0,244$; SE: $4,280 \pm 0,800$; SDE: $1,738 \pm 0,242$; OVX: $4,658 \pm 0,478$; OVXD: $2,516 \pm 0,441$; OVXE: $6,310 \pm 1,189$; OVXDE: $1,578 \pm 0,310$ RNAm NPR-A/26s em unidades arbitrárias; * $p < 0,05$ quando comparado a S; [†] $p < 0,05$ quando comparado a OVX), a ovariectomia não promoveu diferença neste receptor ($p > 0,05$ quando comparado a S).

O receptor tipo C (NPR-C), também se apresentou reduzido nos animais tratados com DN, entretanto, somente quando o exercício físico foi associado a este tratamento (Figura 7, Painel C e D). Neste caso, a ovariectomia promoveu aumento na expressão deste gene, quando comparado ao grupo S (S: $2,410 \pm 0,234$; SD: $2,183 \pm 0,317$; SE: $2,693 \pm 0,566$; SDE: $1,268 \pm 0,116$; OVX: $3,760 \pm 0,155$; OVXD: $4,480 \pm 1,035$; OVXE: $3,375 \pm 0,444$; OVXDE: $1,090 \pm 0,230$ RNAm NPR-C/26s em unidades arbitrárias; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; [†] $p < 0,05$ quando comparado a OVX).

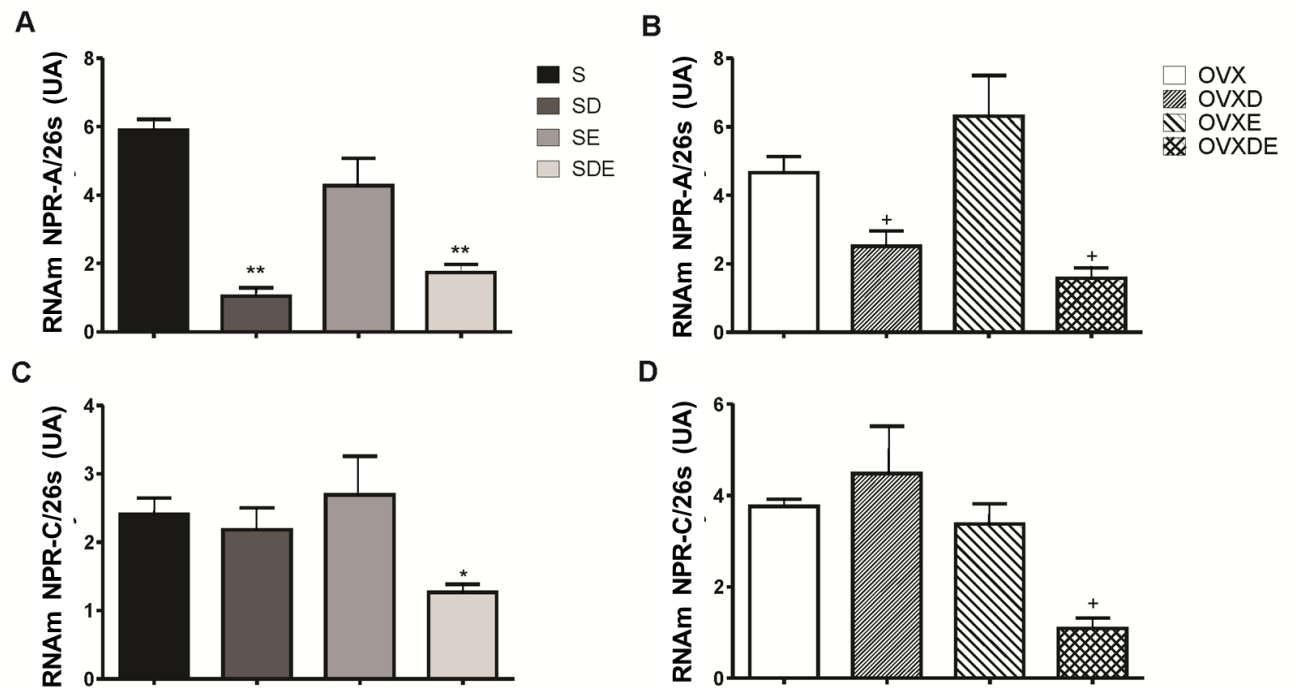


Figura 8: Resultado da expressão gênica do receptor A e C de ANP no rim dos animais tratados com DN e/ou submetidos ao exercício físico resistido em unidades arbitrárias (UA). Painel A e C: Animais submetidos a cirurgia fictícia (S, SD, SE e SDE). Painel B e D: Animais submetidos a ovariectomia (OVX, OVXD, OVXE e OVXDE). Todos os tratamentos foram iniciados após 21 dias do procedimento cirúrgico e foram mantidos por 4 semanas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado a S; + $p < 0,05$ quando comparado a OVX.

A avaliação de hipertrofia cardíaca foi realizada, macroscopicamente, pela relação entre massa do coração pelo comprimento da tíbia (COR/TÍBIA). A relação revelou hipertrofia cardíaca nos animais tratados com DN (SD, OVXD, SDE e OVXDE) bem como nos submetidos ao exercício físico resistido (SE e OVXE) quando comparado aos seus controles (S: $0,186 \pm 0,002$; SD: $0,228 \pm 0,006$; SE: $0,241 \pm 0,021$; SDE: $0,245 \pm 0,005$; OVX: $0,202 \pm 0,006$; OVXD: $0,242 \pm 0,006$; OVXE: $0,234 \pm 0,009$; OVXDE: $0,250 \pm 0,007$ g/cm, Figura 8; Painel I; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX). A confirmação

dessa hipertrofia foi realizada microscopicamente pela avaliação do número de núcleo de miócitos por campo (S: $7,8 \pm 0,5$; OVX: $8,3 \pm 0,2$; SD: $3,6 \pm 0,2$; OVXD: $4,1 \pm 0,2$; SE: $5,6 \pm 0,3$; OVXE: $5,4 \pm 0,3$; SDE: $3,9 \pm 0,3$; OVXDE: $4,4 \pm 0,2$; Figura 8, Painel J; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ** $p < 0,01$ quando comparado a OVX) e da área do núcleo dos miócitos (S: 1135 ± 19 ; OVX: 1114 ± 20 ; SD: 1328 ± 30 ; OVXD: 1390 ± 30 ; SE: 1245 ± 27 ; OVXE: 1200 ± 27 ; SDE: 1341 ± 28 ; OVXDE: $1304 \pm 29 \mu\text{m}^2$; Figura 8; Painel K; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado a OVX).

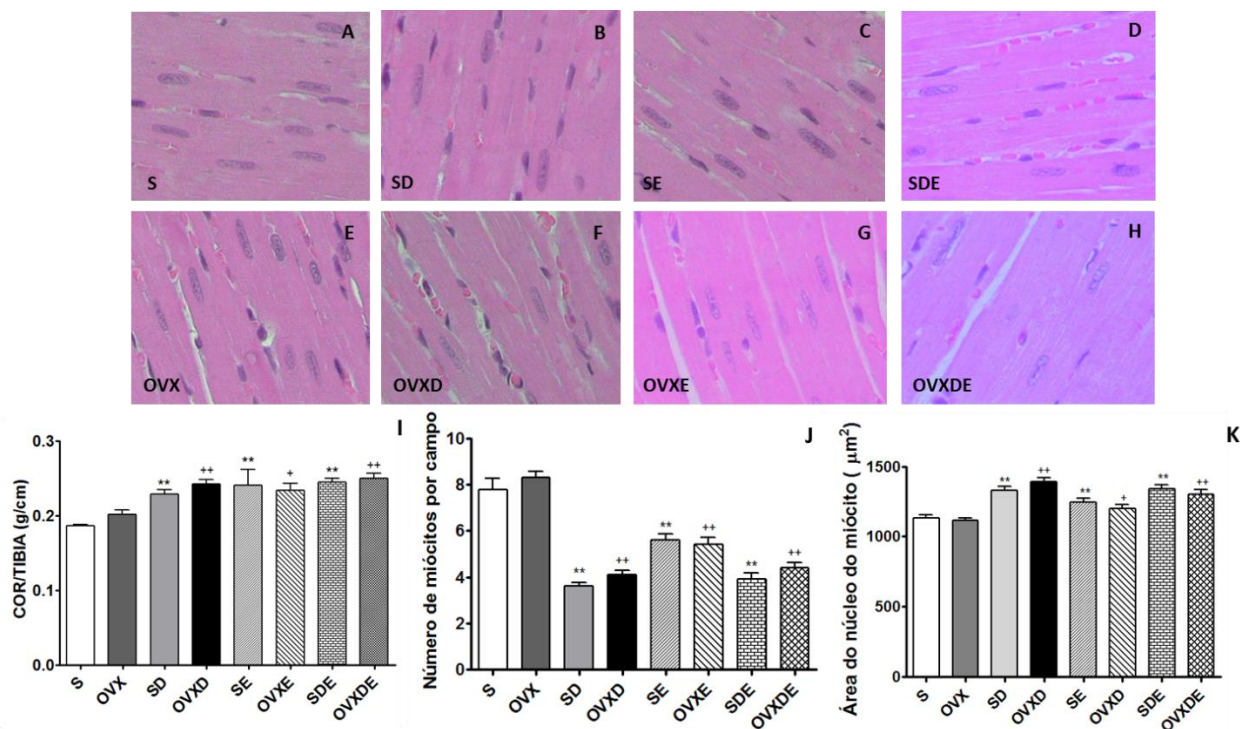


Figura 9: Figuras representativas das lâminas coradas com H&E usadas para a avaliação da morfometria cardíaca (Painéis A-H). Avaliação da hipertrofia cardíaca macro e microscópica por meio da relação entre a massa cardíaca e o comprimento da tíbia (Painel I), número (Painel K) e de miócitos por campo (Painel L), nos diferentes grupos de tratamento. ** $p < 0,01$ quando comparado a S; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado a OVX.

Adicionalmente, foi avaliada pela coloração de Picrossirius red, a deposição de colágeno no tecido cardíaco. Foi observado aumento na quantidade de colágeno cardíaco apenas nos animais tratados com DN, o mesmo não foi encontrado nos grupos apenas submetidos a exercício físico resistido (S: $2,2 \pm 0,2$; OVX: $2,1 \pm 0,1$; SD: $3,5 \pm 0,2$; OVXD: $3,6 \pm 0,1$; SE: $2,2 \pm 0,1$; OVXE: $2,3 \pm 0,1$; SDE: $2,9 \pm 0,1$; OVXDE: $3,1 \pm 0,1$ %; Figura 9, Painel Q; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ** $p < 0,05$ quando comparado a OVX). De modo semelhante aos resultados anteriores, a ovariectomia não alterou esse padrão de resposta. A comparação entre os grupos tratados com DN e submetidos ou não ao exercício físico demonstrou que há diferença na deposição de colágeno entre esses grupos. O exercício físico reduziu a deposição de colágeno neste grupo quando comparado ao mesmo grupo sedentário (§ $p < 0,05$ quando comparado aos respectivos controles sedentários).

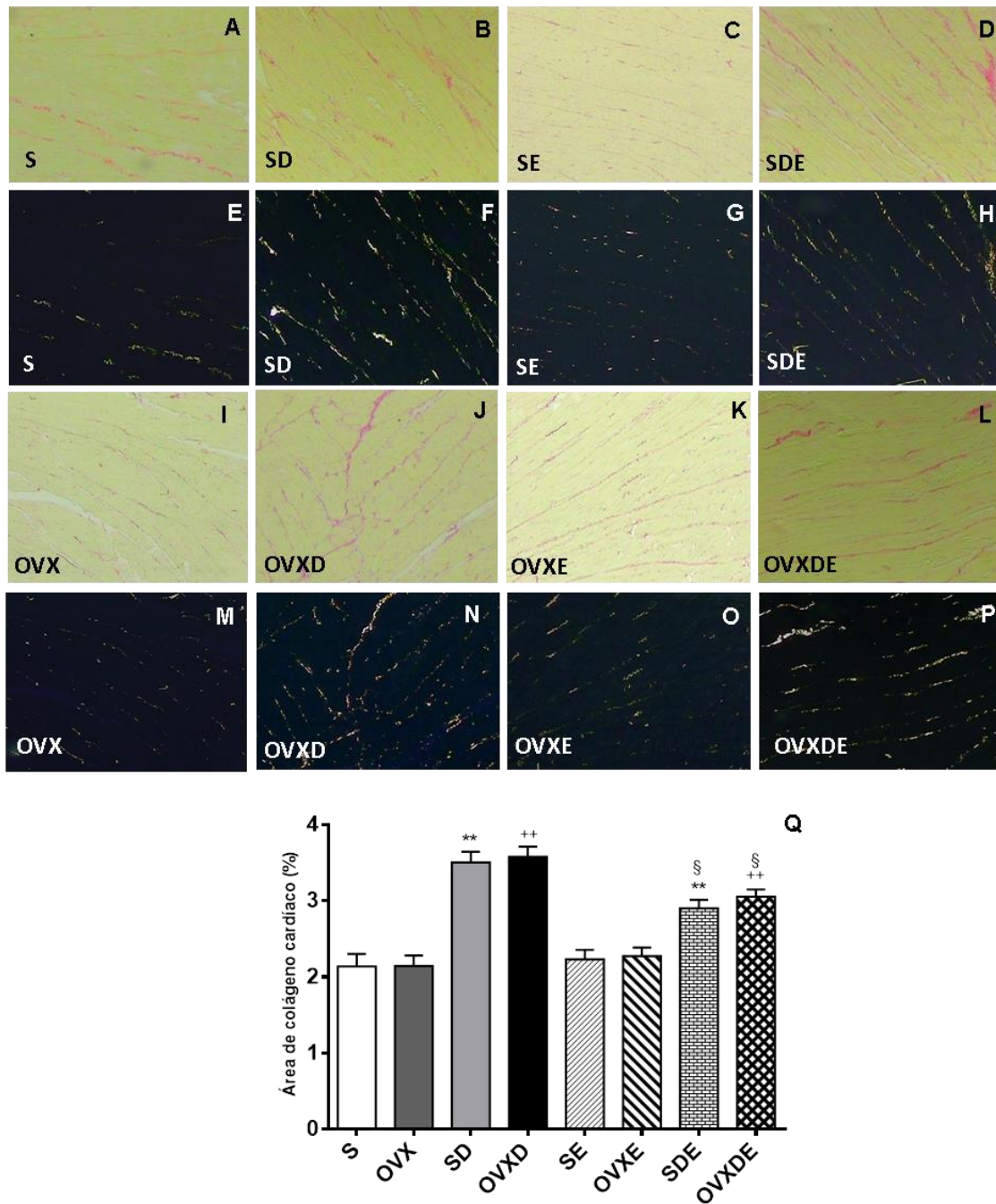


Figura 10: Figuras representativas das lâminas de tecido cardíaco coradas com Picrosirius red (Paineis A-D e I-L) e sob luz polarizada (Paineis E-H e M-P) dos diferentes grupos de tratamento. Paineis E-H e M-P: Percentual da área de colágeno cardíaco depositado no tecido cardíaco dos animais nos diferentes grupos de tratamento. ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX.

Em relação ao rim, o tratamento com DN foi capaz, de aumentar a relação entre massa renal e o comprimento da tíbia em todos os grupos tratados, independente da associação com exercício físico (S: $0,248 \pm 0,012$; SD: $0,304 \pm 0,013$;

SDE: $0,295 \pm 0,012$; OVX: $0,231 \pm 0,007$; OVXD: $0,287 \pm 0,008$; OVXDE: $0,298 \pm 0,009$ g/cm; Figura 11, Painel Q; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX) quando os animais foram submetidos apenas ao protocolo de exercício físico resistido, não foi observada alteração nessa relação (SE: $0,230 \pm 0,007$; OVXE: $0,239 \pm 0,01$; g/cm).

A deposição de colágeno no rim também foi investigada por meio da coloração de Picrossirius red. As lâminas foram avaliadas por luz polarizada, e a análise dos dados mostrou aumento da deposição de colágeno no córtex renal apenas dos animais tratados com DN (S: $2,9 \pm 0,2$; OVX: $3,0 \pm 0,2$; SD: $4,5 \pm 0,3$; OVXD: $4,7 \pm 0,2$; SE: $3,0 \pm 0,3$; OVXE: $3,2 \pm 0,2$; SDE: $4,3 \pm 0,2$; OVXDE: $4,4 \pm 0,3$ %; Figura 11; Painel R; ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX). Os valores de ureia, creatinina e excreção renal de sódio não foram alterados (Tabela 1).

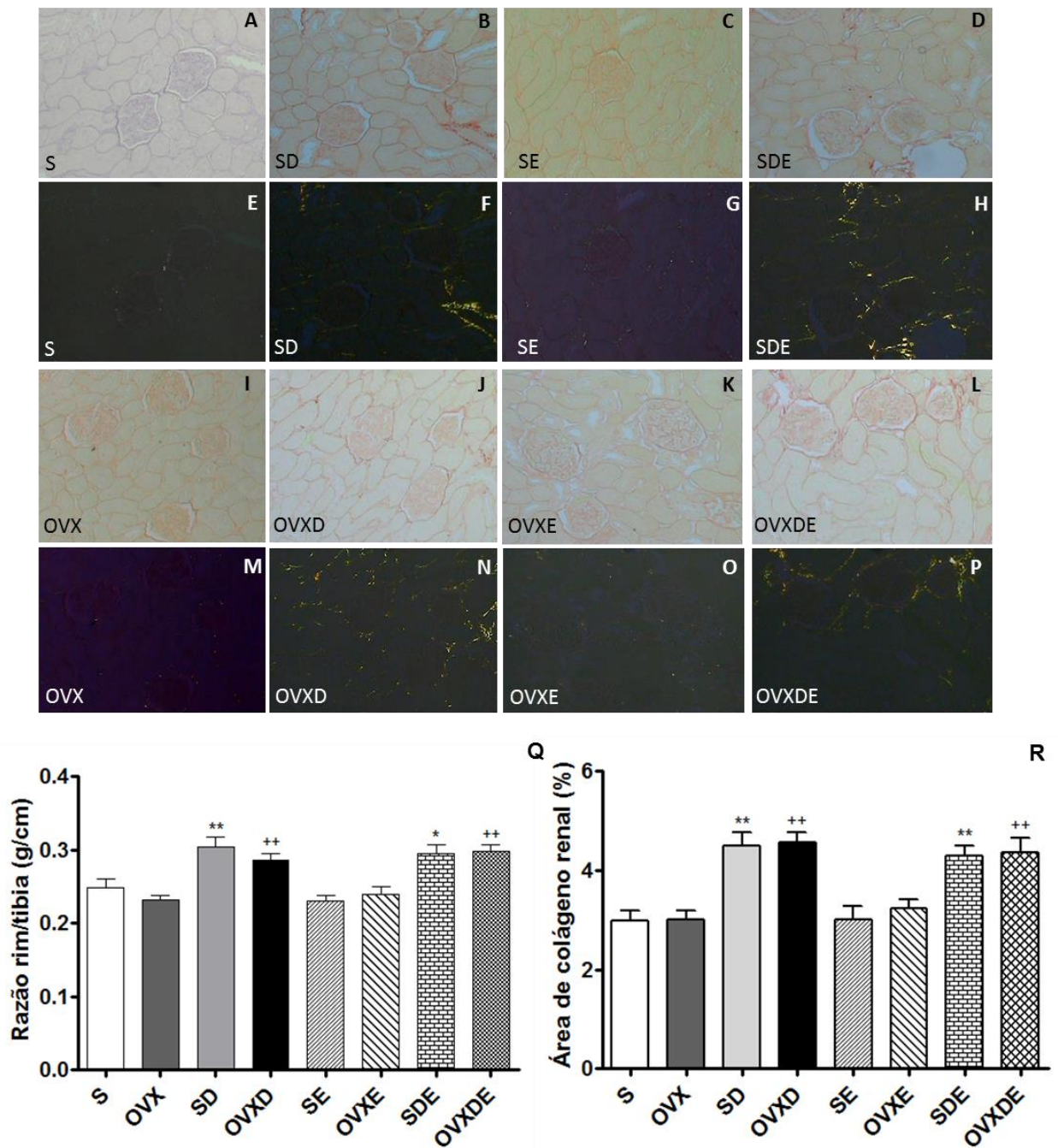


Figura 11: Imagens representativas das lâminas do rim dos animais coradas com Picrosirius red (A-D e I-L) e sob luz polarizada (E-H e M-P), nos diferentes grupos de tratamento. Painel Q: Avaliação da hipertrofia macroscópica renal pela razão massa renal/comprimento da tíbia. Painel R: Análise da área percentual de colágeno no córtex renal. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado a S; ** $p < 0,01$ quando comparado a OVX.

Tabela 1: Valores de creatinina e ureia (soro) e excreção de sódio (urina) dos animais tratados com Decanoato de nandrolona e/ou submetidos a exercício físico por 4 semanas.

Grupos	S	OVX	SD	OVXD	SE	OVXE	SDE	OVXDE
Ureia (mg/dL)	43,9±3.5	45.1±2.2	43.4±4.2	37.6±2.3	39.5±3.8	35.2±5.6	31.7±1.8	35.1±1.5
Creatinina (mg/dL)	0.46±0.04	0.55±0.01	0.51±0.03	0.44±0.03	0.43±0.02	0.43±0.02	0.44±0.03	0.49±0.01
Sódio (mEq/mL)	95.3±30.9	98.3±33.8	101.0±17.8	91.1±9.1	107.0±22.7	115.7±41.8	73.0±5.8	97.3±27.7

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. S: Sham, Veículo; SD: DN 20mg/kg/semana; SE: Exercício resistido 5x semana; SDE: DN+Exercício; OVX: Ovariectomia, veículo; OVXD: DN 20mg/kg/semana; OVXE: Exercício resistido 5x semana; OVXE: DN+Exercício;

Não foi observada alteração na PAM (S: 104±5; OVX: 102±6; SD: 108±4; OVXD: 104±5; SE: 106±7; OVXE: 100±6; SDE: 104±7; OVXDE: 111±2 mmHg) ou FC (S: 357±17, OVX: 361±7, SD: 376±10, OVXD: 344±11, SE: 333±15, OVXE: 352±11, SDE: 343±15, OVXDE: 338±13; bpm) em nenhum dos grupos tratados, bem como não houve alteração no RBJ após o tratamento com DN (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de redução na pressão arterial diastólica (PAD) e na frequência cardíaca (FC) induzidas pela aplicação *in bolus* de fenilbiguanida nos grupos S e OVX tratados com DN e/ou submetidos a exercício físico resistido.

Grupos	Fenilbiguanida ($\mu\text{g}/\text{kg}; \text{iv}$)				
	1,5	3	6	12	24
S					
PAD	43 \pm 9	55 \pm 7	64 \pm 9	72 \pm 10	89 \pm 6
FC	19 \pm 5	35 \pm 4	40 \pm 7	55 \pm 8	60 \pm 6
SD					
PAD	32 \pm 7	48 \pm 7	59 \pm 5	69 \pm 10	78 \pm 6
FC	20 \pm 6	33 \pm 8	38 \pm 7	51 \pm 9	68 \pm 9
SE					
PAD	33 \pm 8	46 \pm 7	51 \pm 9	70 \pm 8	78 \pm 10
FC	19 \pm 8	28 \pm 7	35 \pm 4	46 \pm 9	58 \pm 9
SDE					
PAD	32 \pm 9	47 \pm 4	56 \pm 9	65 \pm 7	72 \pm 10
FC	19 \pm 7	34 \pm 6	38 \pm 8	53 \pm 5	61 \pm 7
OVX					
PAD	46 \pm 6	54 \pm 6	69 \pm 6	74 \pm 10	80 \pm 6
FC	19 \pm 6	35 \pm 8	45 \pm 5	58 \pm 8	68 \pm 5
OVXD					
PAD	47 \pm 9	51 \pm 4	61 \pm 6	68 \pm 8	73 \pm 7
FC	24 \pm 5	41 \pm 7	50 \pm 8	61 \pm 6	65 \pm 6
OVXE					
PAD	50 \pm 6	55 \pm 5	60 \pm 6	67 \pm 5	72 \pm 4
FC	26 \pm 4	40 \pm 5	53 \pm 5	56 \pm 6	68 \pm 5
OVXDE					
PAD	43 \pm 7	50 \pm 8	70 \pm 6	73 \pm 8	82 \pm 9
FC	28 \pm 5	37 \pm 8	51 \pm 6	55 \pm 7	63 \pm 8

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. S: Sham, Veículo; SD: DN 20mg/kg/semana; SE: Exercício resistido 5x semana; SDE: DN+Exercício; OVX: Ovariectomia, veículo; OVXD: DN 10mg/kg/semana; OVXE: Exercício resistido 5x semana; OVXE: DN+Exercício;

A eficiência anabólica do tratamento com DN foi avaliado por meio da relação massa do músculo gastrocnêmio pelo comprimento da tíbia. Pode-se observar que o tratamento com DN, associado ou não ao exercício físico promoveu aumento dessa relação, e que o exercício físico isolado não foi capaz de promover alteração (S: 0,422 \pm 0,016; SD: 0,528 \pm 0,019; SE: 0,415 \pm 0,021; SDE: 0,4884 \pm 0,015; OVX: 0,447 \pm 0,014; OVXD: 0,543 \pm 0,013; OVXE: 0,4394 \pm 0,012; OVXDE: 0,4932 \pm 0,008 g/cm; Figura 12; * p <0,05 quando comparado a S; ** p <0,01 quando comparado a OVX).

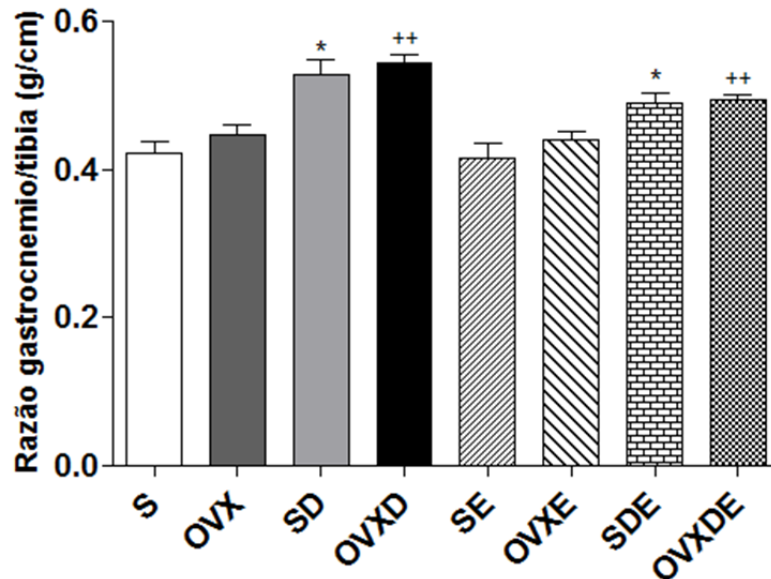


Figura 12: Avaliação da hipertrofia muscular e eficiência anabólica do DN, pela razão massa do gastrocnêmio/comprimento da tibia nos diferentes grupos de tratamento. * $p < 0,05$ quando comparado a S; ++ $p < 0,01$ quando comparado a OVX.

A influência do DN sobre a eficiência do exercício físico resistido foi avaliada pela contagem do número de saltos por minuto dos animais, e revelou aumento do número de saltos nos grupos SDE e OVXDE (SE: $18,46 \pm 0,19$; SDE: $20,22 \pm 0,21$; OVXE: $18,29 \pm 0,21$; OVXDE: $20,14 \pm 0,23$ saltos/minuto; Tabela 3) e todos os grupos estavam em anaerobiose, como indicou a dosagem de lactato sanguíneo (SE: $10,47 \pm 1$; SDE: $10,1 \pm 0,7$; OVXE: $10,7 \pm 0,9$; OVXDE: $10,65 \pm 1$ mmol/dL; * $p < 0,05$ quando comparado a S; + $p < 0,05$ quando comparado a OVX).

Tabela 3: Valores de lactato sanguíneo dos grupos submetidos ao exercício físico resistido

Grupos	Lactato sanguíneo (mmol/dL)	Número de saltos por minuto
SE	10.47±1	18.46±0.19
SDE	10.1±0.7	20.22±0.21*
OVX	10.74±0.9	18.29±0.21
OVXDE	10.65±1	20.14±0.23 ⁺

Dados apresentados como média ± E.P.M.; *p<0,05 quando comparado a SE; ⁺ p<0,05 quando comparado a OVX.

A ovariectomia promoveu aumento no ganho de peso das fêmeas (S: 286±6; OVX: 305±4 g, *p<0,05 quando comparado a S) e o exercício físico não foi capaz de determinar redução neste ganho (OVXE: 310±8 g, *p<0,05 quando comparado a S), entretanto, o tratamento com DN provocou ganho de peso em todos os animais, independente da associação com o exercício (SD: 321±5; SDE: 315±6; OVXD: 331±6; OVXDE: 322±6 g; Tabela 4; *p<0,05 quando comparado a S; ⁺p<0,05 quando comparado a OVX).

Tabela 4: Ganho de peso dos animais tratados com Decanoato de nandrolona e/ou submetidos a exercício físico resistido.

Grupo	Peso final
S	286±6
SD	321±5*
SE	277±10
SDE	315±6*
OVX	305±4*
OVXD	331±6 ⁺
OVXE	310±8* ⁺
OVXDE	322±6 ⁺

Valores apresentados como média ± E.P.M.; *p<0,05 quando comparado a S; ⁺p<0,05 quando comparado a OVX;

Os níveis de 17β -estradiol das ratas submetidas ao tratamento com DN foram reduzidos a valores semelhantes aos dos animais OVX (S: 53 ± 2 ; SD: 31 ± 3 ; SE: 64 ± 8 ; SDE: 32 ± 1 ; OVX: 28.8 ± 4 ; OVXD: 34 ± 2 ; OVXE: 32 ± 3 ; OVXDE: 30 ± 3 pg/mL; * $p < 0,05$ quando comparado a S), quanto ao hormônio testosterona, por outro lado, apresentou-se aumentado em todos os animais submetidos ao tratamento com DN (S: $0,2133\pm 0,0103$; SD: $2,888\pm 0,2496$; SE: $0,1479\pm 0,013$; SDE: $1,364\pm 0,1458$; OVX: $0,1836\pm 0,023$; OVXD: $2,183\pm 0,2101$; OVXE: $0,2856\pm 0,080$; OVXDE: $1,600\pm 0,1496$ pg/mL; Tabela 5; * $p < 0,05$ quando comparado a S; + $p < 0,05$ quando comparado a OVX).

Tabela 5: Valores de testosterona e estrogênio séricos das ratas tratadas e/ou submetidas a exercício físico resistido por 4 semanas.

Grupo	Estrogênio (pg/mL)	Testosterona (pg/mL)
S	53 ± 2	$0,2133\pm 0,0103$
SD	$31\pm 3^*$	$2,888\pm 0,2496^*$
SE	64 ± 8	$0,1479\pm 0,013$
SDE	$32\pm 1^*$	$1,364\pm 0,1458^*$
OVX	$28.8\pm 4^*$	$0,1836\pm 0,023$
OVXD	$34\pm 2^*$	$2,183\pm 0,2101^+$
OVXE	$32\pm 3^*$	$0,2856\pm 0,080$
OVXDE	$30\pm 3^*$	$1,600\pm 0,1496^+$

Resultados apresentados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado a S; + $p < 0,05$ quando comparado a OVX; $\S p < 0,05$ quando comparado a S.

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi o aumento da expressão gênica de ANP no átrio e redução da expressão gênica de seus receptores renais em ratas tratados com DN, além de hipertrofia cardíaca e renal, com aumento de deposição de colágeno tecidual, entretanto sem proporcionar mudanças nas propriedades funcionais nos sistemas estudados.

O ANP é armazenado na forma de grânulos nos cardiomiócitos atriais, e a sua liberação ocorre por meio de diversos estímulos, como aumento da distensão da parede atrial (Brenner et al., 1990), e de outras substâncias produzidas pelo organismo, como angiotensina II, norepinefrina e endotelina (De Vito, 2014; Demerath et al., 2014; Schiebinger & Greening, 1992). Uma vez liberado dos grânulos para a corrente sanguínea, o peptídeo age especialmente no rim, promovendo aumento da natriurese e diurese e conseqüente redução na pressão arterial. Adicionalmente, outros mecanismos estão envolvidos na redução da pressão arterial promovida pelo ANP, como vasodilatação e inibição de outros sistemas, como o SRA (Demerath et al., 2014; Potter, Abbey-Hosch & Dickey, 2006).

Desse modo, diversos fatores como obesidade (Wang et al., 2004), exercício físico (Souza et al., 2015; Endlich et al., 2011), hipertrofia cardíaca (Holtwick et al., 2003; Klein et al. 1995; Ruskoahoo 1992) e insuficiência cardíaca (Zabarovskaja et al., 2015; Klein et al. 1995) podem alterar de alguma maneira a síntese e liberação desse peptídeo no organismo.

Dentre esses fatores, a hipertrofia cardíaca é especialmente correlacionada com o ANP, e pode ser caracterizada pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos, causada por diversos estímulos fisiopatológicos (Lorell & Carabello, 2000) e

sistemas fisiológicos importantes como o SRA (Piratello et al., 2010; Li et al., 2008; Crowley et al., 2006).

Dados anteriores demonstram que a utilização de EAA é capaz de promover hipertrofia cardíaca e estimular a deposição de colágeno, e que a hipertrofia cardíaca desenvolvida tem participação importante do SRA (Franqui et al. 2013; Andrade et al. 2011; Tanno et al. 2011; Bissoli et al. 2009). Os dados precedentes demonstram que DN promove alteração na fisiologia cardiovascular de machos tratados com dose de abuso, de uma forma dose e tempo dependente (Franqui et al., 2013; Bissoli et al., 2009).

Em estudo publicado por Franqui et al., (2013), utilizando dose (20 mg/kg) e tempo de tratamento (4 semanas) semelhante ao do presente estudo, foi possível observar hipertrofia com deposição de colágeno e desenvolvimento de hipertensão nos animais tratados. Esses dados demonstram claramente uma diferença entre sexos nas respostas ao tratamento com DN, tendo em vista que machos apresentaram alteração na fisiologia do sistema cardiovascular, enquanto que em fêmeas sob o mesmo protocolo experimental, isso não foi observado.

Diversas pesquisas correlacionam o ANP com a hipertensão (Chandra et al., 2015; Demerath et al., 2014; Levin et al., 1998). Chandra et al. (2015) em estudo realizado em humanos com hipertensão essencial, observaram redução de 87% na expressão gênica e proteica do ANP nos pacientes hipertensos. Além disso, o gene que expressa a enzima Aldosterona sintase (CYP11B2) encontrava-se elevado no mesmo grupo de pacientes, bem como a expressão proteica dessa enzima quando comparado ao grupo controle, sugerindo, assim que esses sistemas se contrabalanceiam, e que a menor liberação de ANP nesse grupo, poderia ser atribuída à hipertensão observada nesses pacientes.

De modo complementar, Demerath et al., (2014) investigaram o mecanismo pelo qual o ANP influencia a liberação de renina pelo rim, tendo em vista que na hipertensão renovascular ocorre aumento de ANP, mas também de renina. Para tanto, foram utilizados camundongos *knockout* para ANP e seu receptor NPR-A. Foi possível observar que com a retirada do ANP ou do NPR-A, os animais desenvolveram hipertensão, porém não houve exacerbação na liberação de renina no grupo dois rins e um clipe (2R1C), quando comparado ao grupo SHAM. Por meio desse estudo é possível observar que o ANP pode promover suas ações de modo direto, e não apenas pela modulação de outros sistemas fisiológicos, assim, este peptídeo exerce papel chave no controle da pressão arterial.

Pode-se também, inferir que o aumento na expressão gênica de ANP observada no presente estudo, pode ter sido, pelo menos em parte, responsável pela manutenção da pressão arterial em níveis normais nas fêmeas tratadas com DN, e que talvez, esse peptídeo possa ser o responsável pela diferença sexual nas respostas ao tratamento.

O ANP é conhecidamente anti-hipertrofico. Em 2001 Knowles e colaboradores observaram que animais *Knockout* para o receptor A, mesmo não desenvolvendo hipertensão, apresentavam hipertrofia cardíaca. Recentemente, Moubarak et al., (2015) evidenciaram em estudos *in vitro*, que a presença do ANP reduz a proliferação e diferenciação de fibroblastos cardíacos, bem como a liberação de colágeno por essas células. Esses estudos demonstram a ação anti-proliferativa e anti-fibrótica do ANP. Por outro lado, estudos demonstram papel importante do SRA no desenvolvimento da hipertrofia e fibrose cardíaca (Piratello et al., 2010) inclusive em animais tratados com DN (Andrade et al., 2011), indicando que os dois sistemas podem atuar de fato, contrabalanceando-se em suas ações fisiológicas.

Levando em consideração os trabalhos previamente publicados, utilizando DN e avaliando a deposição de colágeno, é possível observar que em machos a deposição é muito acentuada quando comparada a seus controles. No estudo publicado por Franquni et al., (2013) é observado aumento de quase 1000% nos valores de colágeno tecidual, resultado semelhante é observado por Tanno et al., (2011) e por Lima et al., (2015) nos animais treinados e tratados. Entretanto, não podemos afirmar que o tratamento em machos não promove aumento do sistema de ANP, tendo em vista que esse dado não foi encontrado na literatura. Mas podemos especular, levando em consideração as diferenças entre os sexos, que nos machos, pode não ocorrer aumento do sistema do ANP de modo semelhante ao observado nas fêmeas, não impedindo desta forma, a maior deposição de colágeno no coração desses animais.

Tanno et al., (2011) demonstraram que o tratamento com DN (10 mg/kg) associado ao exercício físico resistido promove remodelamento cardíaco intenso, com deposição de colágeno e reativação de genes fetais. Dentre os genes fetais avaliados, o ANP apresentou-se elevado apenas no grupo que associou exercício físico e uso de DN. Esse estudo prolongou-se com o publicado por Neves et al., (2013), onde foi demonstrado que o mesmo protocolo de tratamento, promoveu alteração no eletrocardiograma e aumento da expressão de receptores β -adrenérgicos no miocárdio.

Em ambos os trabalhos é possível notar anulação dos efeitos benéficos promovidos pelo exercício físico quando associado o uso de EAA. Tanno et al., (2011) demonstraram hipertrofia adaptativa nos animais submetidos ao exercício, sem reexpressão de genes fetais ou deposição de colágeno, do mesmo modo

Neves et al., (2013) evidenciaram que o exercício não promove aumento da expressão de receptores β , dificultando assim o aparecimento de arritmias.

Nossos resultados demonstram que o exercício físico resistido foi capaz de promover hipertrofia cardíaca nos animais, contudo sem causar aumento da expressão gênica de ANP. A hipertrofia cardíaca associada com exercício resistido é atribuída à ação fisiológica do organismo, representando uma adaptação do coração ao aumento da carga de trabalho (D'Andrea et al. 2006; Lorell & Carabelo, 2000; Suman et al. 2000). Colan (1992) discorre que em atletas é comum observar dilatação ventricular com preservação da relação entre massa e volume, enquanto outros atletas apresentam alteração nessa relação tendo, portanto, hipertrofia concêntrica que consiste em aumento da relação massa e volume cardíaco. Em ambos os casos, a função ventricular é sempre preservada.

Em revisão realizada por Fernandes et al., (2011) é possível observar que o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca adaptativa é comum ao exercício físico, e que o tipo de atividade tende a promover diferentes formas de hipertrofia, logo, exercícios resistidos causam aumento nos miócitos e redução da câmara ventricular, sendo caracterizada como concêntrica, enquanto as atividades aeróbicas promovem hipertrofia excêntrica caracterizada por aumento da câmara cardíaca. Em todos os tipos de hipertrofia fisiológica, o fator determinante é que não há prejuízo na função cardíaca.

Estudos demonstram que a hipertrofia causada por uso de EAA é patológica, e concêntrica (Nascimento et al., 2016; Frati et al., 2015; Tanno et al., 2011). Nascimento et al., (2016) demonstrou que há hipertrofia concêntrica (adição de sarcômeros em paralelo) e deposição de colágeno no miocárdio de ratas tratadas com DN igual ao presente estudo. Entretanto, a análise da função cardíaca, mostrou

aumento do relaxamento e da contração cardíacos após o tratamento. Esse resultado difere dos dados prévios publicados em machos (Norton et al., 2000; Trifunovic et al., 1995), demonstrando assim que há diferença de sexo importante, no tocante a resposta fisiológica do uso desse tipo de drogas em fêmeas. Adicionalmente, assim como no presente estudo, apesar do aumento na deposição de colágeno ser significativa (SD: $3,5\pm 0,2$; OVXD: $3,6\pm 0,1$; SDE: $2,9\pm 0,1$; OVXDE: $3,1\pm 0$ %) ela pode ser considerada leve, tendo em vista que a quantidade normal de colágeno no miocárdio é de cerca de 2,2% (Medugorac, 1982). Deste modo a fibrose pode não ter sido suficiente para promover prejuízo na função cardíaca.

Apesar dos efeitos positivos do exercício físico, o uso de EAA, mesmo associado à atividade física, promove disfunções cardiovasculares como arritmias cardíacas (Alizade et al., 2015), que associadas com a hipertrofia patológica, promovem aumento do número de mortes súbitas entre usuários de EAA (Darke et al., 2014; Montisci et al., 2012). Em estudos de caso realizados em homens atletas (DiPaolo et al., 2007) e não atletas (Petersson et al., 2006), bem como em mulheres atletas (Thiblin, Mobini-Far e Frisk, 2009), observou-se morte de indivíduos jovens, associada ao uso de polidrogas, incluindo EAA com o intuito de levar a melhora da aparência física e desempenho atlético. Nas mulheres que fazem uso de EAA, foi observado o aumento de 10 vezes o valor normal de testosterona e epinefrina no soro, sem o indicativo de uso de outras drogas ilícitas, o que pode estar relacionado ao surgimento de arritmia repentina e morte dos usuários (Thiblin, Mobini-Far e Frisk, 2009).

O aumento da pressão arterial sustentada, remodelamento cardíaco e disfunção ventricular causam a médio e longo prazo, o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Díez, 2014), que é um problema de saúde grave, e que

quando associado à hipertrofia, pode levar os pacientes a morte súbita (Toukola et al., 2015).

Estudos experimentais demonstram que os benefícios do exercício físico são perdidos quando associado ao uso de EAA. Marques-Neto et al., (2014) demonstram em estudo utilizando a técnica de Langendorff para isquemia-reperfusão em coração isolado, que o exercício físico do tipo endurance de média intensidade, promove redução da área infartada e maior tolerância ao processo de isquemia-reperfusão. Entretanto, quando há associação entre o exercício e o DN (10mg/kg) esses efeitos benéficos são abolidos. Neste mesmo estudo foi possível observar que existe participação importante do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) nesse processo, tendo em vista que estes efeitos deletérios são prevenidos quando os animais são tratados com antagonista de receptor AT1 (losartan) ou antagonista de receptor mineralocorticoide (Espironolactona). No modelo utilizado no presente estudo é possível observar que o exercício físico não impediu os efeitos deletérios do DN de hipertrofia cardíaca e renal com deposição de colágeno tecidual, porém é possível observar o efeito protetor do exercício por meio da redução do receptor de clearance (NPRC). Essa redução pode ter contribuído para a intensificação das ações do ANP nestes animais.

Com relação aos receptores A (NPR-A) e C (NPR-C) de ANP localizados no rim observou-se que há uma redução na expressão do receptor A no rim dos animais tratados com DN, independentemente da associação com exercício físico, entretanto o receptor C só apresentou-se reduzido quando houve associação com o exercício físico. A literatura demonstra que quando ocorre aumento na liberação de ANP pelos átrios, a expressão do receptor é reduzida, por possível mecanismo de feedback negativo (Flora & Potter, 2010; Bryan et al., 2007). Desse modo pode-se

inferir que esse seja o mecanismo da queda na expressão deste receptor no presente estudo.

Flora & Potter (2010) demonstraram em estudo com células, que a exposição prolongada ao ANP promove redução da expressão proteica do NPR-A de maneira tempo-dependente, semelhante ao que ocorre em animais com insuficiência cardíaca congestiva, onde há aumento agudo na produção de ANP e BNP, o que culmina em redução da expressão do seu receptor (Bryan et al., 2007).

De maneira semelhante, Endlich et al. (2011) observaram aumento na concentração de ANP plasmático após exercício com natação em ratos SHR e redução no seu receptor A renal, que foi atribuído nesse estudo, a elevação de seu ligante no plasma. Desse modo pode-se associar a redução do NPR-A observada no presente estudo, ao aumento da expressão gênica do ANP no átrio.

O receptor de clearance tipo C (NPR-C) apenas mudou seu padrão de expressão quando houve a associação do exercício físico com o uso de DN (grupos SDE e OVXDE), reduzindo a sua expressão nesses animais. Além disso, nesse grupo houve uma redução na deposição de colágeno, quando comparado ao grupo sedentário. Observando esses dois aspectos pode-se inferir que a redução na expressão de NPR-C pode ser uma medida adaptativa e benéfica do exercício físico, pois com a redução na atividade desse receptor, mais ANP circulante estará disponível, podendo assim, exercer suas atividades fisiológicas de maneira satisfatória. Outrossim, a redução na expressão do NPR-C pode ser uma adaptação a intensidade do treino resistido, conforme descrito por Shanshan et al., (2005), onde observaram que a intensidade do exercício físico reduz a expressão gênica de NPR-C, o que contribui para o aumento dos níveis plasmáticos de ANP, uma vez que a retirada deste hormônio da circulação estará reduzida. Os animais do grupo

SDE e OVXDE apresentaram maior número de saltos por minuto, indicando uma intensidade maior de exercício nesses animais.

O ciclo estral das ratas é regulado pelos hormônios sexuais, sendo os níveis plasmáticos de estrogênio, progesterona e dos hormônios LH e FSH importantes para esse processo (Tandon & Chintala, 2001). Assim, o tratamento com DN ao promover alteração nas concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais, interrompe o ciclo das ratas, mantendo as fêmeas em Diestro II (Gerez et al. 2005; Blasberg and Clark 1997; Van Der Vies, 1965).

Os principais estudos experimentais utilizando DN são para verificar os efeitos na reprodução. Visser & Overbeek (1960) demonstraram que o tratamento com DN é capaz de promover ações antiestrogênicas a partir da dose de 1,0 mg/kg. Nesta dose foi possível observar redução no peso dos ovários e adrenais, enquanto a dose de 0,25 mg/kg foi capaz de impedir o ciclo estral destas ratas, assim elas não foram capazes de entrar no estro durante os 14 dias de tratamento. Recentemente Bordbar et al., (2014) estudando o efeito de diferentes doses de DN sobre o sistema reprodutor de fêmeas, observaram que as doses de 3 e 10 mg/kg/semana eram capazes de promover alterações nos ovários de ratas tratadas. Os principais efeitos notados foram diminuição no volume total, cortical, e no número de folículos ovarianos de uma maneira dose-dependente. Estes efeitos podem ser relacionados com a ação do DN sobre a liberação de gonadotrofinas e hormônios sexuais, visto que o DN promoveu redução na concentração de FSH, LH, estrogênio e progesterona em ambas as doses estudadas.

Como já citado anteriormente, os hormônios sexuais são fatores importantes que podem alterar a expressão do ANP. No presente estudo, foi observado aumento nos níveis de testosterona plasmática nas ratas tratadas com DN, e o exercício não

alterou essa resposta. Hong et al., (1992) demonstraram que a testosterona é capaz de promover aumento na expressão de ANP. Pereira et al., (2008) demonstraram ainda, que o ANP estimula a síntese de testosterona, o que pode justificar o aumento nos níveis de testosterona observados no presente estudo, ocorrendo assim, uma retroalimentação positiva. Baseados nestes dados, podemos dizer que a ação do DN parece ser mais importante para a estimulação do ANP do que a deficiência de estrogênio, apesar de a literatura descrever que o estradiol influencia a liberação de ANP (Medeiros et al., 2012; Jankowski et al., 2001; Hong et al., 1992) pelo átrio.

Como relatado anteriormente, o tratamento com DN é capaz de alterar a capacidade reprodutiva e a histopatologia do útero e ovário de ratas (Belardin et al., 2014; Far et al., 2007; Gerez et al., 2005; Blasberg & Clark 1997). Adicionalmente, foi avaliado o período necessário para a recuperação destas alterações. Foi possível observar que a recuperação dos tecidos foi dose e tempo dependente, entretanto, após 60 dias, o grupo que recebeu a maior dose (15 mg/kg) não apresentou reversão dos efeitos, demonstrando incapacidade reprodutiva e não-gestação.

O tratamento crônico com DN promoveu mudança na ultraestrutura renal, promovendo hipertrofia nos grupos tratados com DN, submetidos ou não ao exercício físico e deposição de colágeno. Esses resultados, porém, não modificaram a excreção de sódio, ureia e creatinina nesses animais.

Sobre os efeitos renais observados, a literatura evidencia que os receptores androgênicos são expressos no rim (Chang et al. 1995), e que os hormônios sexuais podem promover crescimento celular, incluindo hipertrofia (Gelman, 2002). Além disso, foi reportado que o DN pode promover hipertrofia nos túbulos contorcidos proximais e distais em fêmeas, além do volume do córtex renal estar aumentado nos

camundongos tratados. Esses efeitos foram atribuídos à ação direta sobre os receptores de andrógenos nos rins (Hoseini et al. 2009).

Gava et al., (2011) em revisão de literatura, indicou que os andrógenos podem promover efeitos negativos no rim. Babicková et al., (2015) avaliou a influência da testosterona administrada ainda no pré-natal de ratos, e observou que este hormônio é capaz de aumentar a proteinúria nos animais tratados (2 mg/kg) tanto em machos quanto em 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. Baseado no conhecimento da influência dos receptores de androgênio no rim, os dados relativos ao aumento na deposição de colágeno tecidual nesse órgão, observado em nosso estudo, podem ser atribuídos a ação direta do DN nos receptores androgênicos presentes neste local. Entretanto, as mudanças na ultraestrutura renal (deposição de colágeno), não foram suficientes para promover mudanças no padrão de excreção renal de creatinina e sódio. Adicionalmente, acredita-se que a participação do ANP pode ter sido favorável para a observação desses resultados.

Com relação à pressão arterial, o tratamento com DN nas fêmeas não foi capaz de promover aumento na pressão arterial, e tão pouco alterar a sensibilidade do RBJ. Dados do nosso grupo em machos, utilizando mesma dose de DN do presente estudo, promoveram redução na sensibilidade deste reflexo e desenvolvimento de hipertensão tanto em animais sedentários (Franquni et al., 2013), quanto em animais submetidos a treinamento resistido 2 vezes por semana (Lima et al., 2015), evidenciando que o exercício físico não foi capaz de prevenir os efeitos deletérios cardiovasculares nesses animais.

Por fim, os animais do presente estudo apresentaram ganho de peso e aumento da relação peso do gastrocnêmio/tíbia, demonstrando assim eficiência anabólica nesses animais. Os EAA podem ser indicados para tratamento de pacientes que apresentem atrofia muscular, pois eles melhoram o balanço de nitrogênio e previnem a perda de massa magra (Hartgens & Kuipers, 2004; Grinspoon et al., 1996) Em revisão sistemática sobre o ganho de massa muscular em pacientes idosos, Neto et al., (2015) revelaram que a reposição hormonal com testosterona promove aumento de massa magra e perda de gordura corporal em pacientes, sendo indicado para tratamento de doenças onde há perda de massa muscular grave.

Em trabalho experimental realizado com camundongos machos tratados com o esteroide mesterolona, foi possível observar que a associação do tratamento com o exercício físico não promoveu ganho extra de peso corpóreo. Quanto ao ganho de massa nos músculos estudados (sóleo, gastrocnêmio e tibial anterior), foi observado que o tratamento aumentou a massa magra nestes músculos, tanto nos animais sedentários quanto no grupo exercício, indicando que este EAA promove ganho de massa muscular independentemente da realização de exercício físico (Fontana et al., 2013). Em outro estudo, realizado por Choo, Emery & Rothwell (1991) utilizando fêmeas tratadas com propionato de nandrolona em diferentes doses (1, 4 e 10 mg/kg) foi possível notar ganho de massa e aumento da proteína corporal, de até 9% na maior dose, além de redução drástica na gordura corporal total (32%). Adicionalmente, White et al., (2013) demonstram que o tratamento com DN promove reversão da perda de massa magra em camundongos machos, assim como promove aumento do músculo gastrocnêmio em fêmeas (Bisschop et al. 1997). Desse modo o ganho de peso corporal e o aumento da razão entre o peso do

músculo gastrocnêmio e o comprimento da tíbia observados no presente estudo, foram esperados e condizentes com o previamente descrito na literatura, e podem ser associados ao balanço positivo de nitrogênio e redução da gordura corporal total dos indivíduos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento crônico com alta dose de decanoato de nandrolona promove alterações no sistema de ANP em fêmeas. O exercício físico resistido e a retirada de estrogênio não foram capazes de modificar essa resposta nestes animais. Adicionalmente, a hipertrofia renal e cardíaca induzidos pelo tratamento não foram capazes de promover mudanças na pressão arterial ou na sensibilidade do Reflexo Bezold-jarisch o que pode demonstrar um efeito cardioprotetor do ANP.

7 REFERENCIAS

ABRAHIN, OSC; de SOUSA, EC; SANTOS, AM. Prevalence of the use of anabolic-androgenic steroids in Brazil: a systematic review. *Substance Use & Misuse*, v. 49, nº 9, p. 1156-62, 2014.

ALIZADE, E; AVCI, A; FIDAN, S; TABAKÇI, M; BULUT, M; ZEHIR, R; SIMSEK, Z; EVLICE, M; ARSLANTAS, U; ÇAKIR, H; EMIROGLU, MY; AKÇAKOYUN, M. The effect of chronic anabolic-androgenic steroid use on Tp-E Interval, Tp-E/Qt Ratio, and Tp-E/QtC Ratio in male bodybuilders. *Annals of Noninvasive Elettrocardiology*, v. 00, p. 1-9, 2015.

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

ANDRADE, TU; PINTO, VD; MEDEIROS, ARS; ABREU, GR; MOYSES, M; SAMPAIO, KN; BISSOLI, NS. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of the cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, v. 34, p. 606-611, 2007.

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

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

BABICKOVÁ, J; BORBÉLYOVÁ, V; TÓTHOVÁ, L; KUBISOVÁ, K; JANEĞA, P; HODOSY, J; CELEC, P. The Renal Effects of Prenatal Testosterone in Rats. *The Journal of Urology*, v. 193, p. 1700-1708, 2015.

BANFI, G; COLOMBINI, A; LOMBARDI, G; LUBKOWSKA, A. Metabolic markers in sports medicine. *Advances in clinical chemistry*, v. 56, nº 6, p. 1-54, 2012.

BARAUNA, VG; MAGALHAES, FC; KRIEGER, JE; OLIVEIRA, EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, nº 2, p. R381-7, 2008.

BASARIA, S; WAHLSTROM, JT; DOBS, AS. Anabolic-Androgenic Steroid Therapy in the Treatment of Chronic Diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, nº 11, p. 5108-5117, 2001.

BELARDIN, LB; SIMÃO, VA; LEITE, GAA; CHUFFA, LG; CAMARGO, ICC. Dose dependente effects and reversibility of the injuries caused by nandrolone decanoate in uterine tissue and fertility of rats. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, v. 101, nº 2, p. 168-177, 2014.

BISSCHOP, A; GAYAN-RAMIREZ, G; ROLLIER, H; DEKHUIJZEN, PNR; DOM, R; De BOCK, V; DECRAMER, M. Effects of nandrolone decanoate on respiratory and peripheral muscles in male and female rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 82, p. 1112-1118, 1997.

BISSOLI, NS; CICILINI, MA; VASQUEZ, EC; CABRAL, AM. The diuretic chlorthalidone normalizes barorreceptor and bezold-jarisch reflexes in DOCA-salt hypertensive rats. *Pharmacological Research*, v. 41, p. 483-491, 2000.

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

BLASBERG, ME; CLARK, AS. Anabolic-androgenic steroid effects on sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and behavior*, v. 32, nº 3, p.201-208, 1997.

BORDBAR, H; MESBAH, F; TALAEI, T; DEGHANI, F; MIRKHANI, H. Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, v. 39, nº 1, p. 44-50, 2014.

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

BRENNER, BM; BALLERMANN, BJ; GUNNING, ME; ZEIDEL, ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Reviews*, v. 70, nº 3, p. 665-699, 1990.

BRYAN, PM; XU, X; DICKEY, DM; CHEN, Y; POTTER, LR. Renal hyporesponsiveness to atrial natriuretic peptide in congestive heart failure results from reduced atrial natriuretic receptor concentrations. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 292, nº 5, p. F1636-F1644, 2007.

BUSARDÒ, FP; FRATI, P; Di SANZO, M; NAPOLETANO, S; PINCHI, E; ZAAMI, S; FINESCHI, V. The Impact of Nandrolone Decanoate on the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 122-131, 2015.

CAMARGO, IC; LEITE, GA; PINTO, T; RIBEIRO-PAES, JT. Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Experimental Toxicology and Pathology*, v. 66, nº 4, p. 195-202, 2014.

CARMO, CA; GONÇALVES, ALM; SALVADORI, DMF; MAISTRO, EL. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *Journal of Applied Toxicology*, v. 32, p. 810-814, 2011.

CATO, ACB; NESTL, A; MINK, S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, v. 2002, nº 138, 2002.

CELOTTI, F; CESI, PN. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43, nº 5, p. 469-77, 1992.

CHANDRA, S; SALUJA, D; NARANG, R; BHATIA, J; SRIVASTAVA, K. Atrial natriuretic peptide and aldosterone synthase gene in essential hypertension: A case-control study. *Gene*, v. 567, p. 92-97, 2015.

CHANG, C; SALTZMAN, A; YEH, S; YOUNG, W; KELLER, E; LEE, H.J. et al.,
Androgen receptor: an overview. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, v. 5,
p. 97-125, 1995.

CHAPLEAU, MW; HAJDUCZOK, G; ABBOUD, FM. Mechanisms of resetting of
arterial baroreceptors: An overview. *American Journal of Medical Sciences*, v. 295, p.
327-334, 1988.

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

CHOO, JJ; EMERY, PW; ROTHWELL, NJ. Dose-dependent effects of an
anabolic steroid, nandrolone phenylpropionate (Durabolin), on body composition and
muscle protein metabolism in female rats. *Annals of nutrition & metabolism*, v. 35, nº
3, p. 141-147, 1991.

COLAN, SD. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in
physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiology clinics*, v. 10, nº 2, p. 227-
240, 1992.

CROWLEY, SD; GURLEY, SB; HERRERA, MJ; RUIZ, P; GRIFFITHS, R;
KUMAR, AP; KIM, HS; SMITHIES, O; LE, TH; COFFMAN, TM. Angiotensin II causes
hypertension and acrdiac hypertrophy through its receptors in the kidney.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.
103, p. 17985-17990, 2006.

CUNHA, TS; MOURA, MJCS; BERNARDES, CF; TANNO, AP; MARCONDES, FK. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension*, v. 46, n° 4, p. 1010–1015, 2005.

D'ANDREA, A; D'ANDREA, L; CASO, P; SCHERILLO, M; ZEPELLI, P; CALABRÒ, R. The usefulness of doppler myocardial imaging in the study of the athlete's heart and in the differential diagnosis between physiological and pathological ventricular hypertrophy. *Echocardiography*, v. 23, p. 149-157, 2006.

DARKE, S; TOROK, M; DUFLOU, J. Sudden or unnatural deaths involving anabolic-androgenic steroids. *Journal of Forensic Sciences*, v. 59, n° 4, p. 1025-1028, 2014.

De BOLD, AJ; BORENSTEIN, HB; VERESS, AT; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences*, v. 28, n° 1, p. 89-94, 1981.

De VISSER, J; OVERBEEK, GA. Pharmacological properties of nandrolone decanoate. *Acta Endocrinologica*, v. 35, p. 405-412, 1960.

De VITO, P. Atrial natriuretic peptide: An old hormone or a new cytokine? *Peptides*, v. 58, p. 108-116, 2014.

DEMERATH, T; STAFFEL, J; SCHREIBER, A; VALLETTA, D; SCHWEDA, F. Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *American Journal of Physiological and Renal Physiology*, v. 306, p. F1489-F1498, 2014.

Di PAOLO, M; AGOZZINO, M; TONI, C; LUCIANI, AB; MOLENDINI, L; SCAGLIONE, M; INZANI, F; PASOTTI, M; BUZZI, F; ARBUSTINI, E. Sudden anabolic steroid abuse-related death in athletes. *International Journal of Cardiology*, v. 114, n° 1, p. 114-117, 2007.

DICKERMAN, RD; SCHALLER, F; PRATHER, I; MCCONATHY, WJ. Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology*, v. 86, p. 172-173, 1995.

DIETZ, JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovascular Research*, p. 68, p. 8-17, 2005.

DÍEZ, J. Arterial hypertension in patients with heart failure. *Heart failure clinics*, v. 10, nº 2, p. 233-242, 2014.

Dos SANTOS, RAS; SAMPAIO, WO. Sistema renina-angiotensina: aspectos fisiopatológicos. *Hipertensão*, v. 5, nº 2, p. 52-58, 2002.

ELLIOT, DI; GOLDBERG, L. Women and anabolic steroids. In: YESALIS, CE (Org.). *Anabolic steroids in sport and exercise*. Champaign, IL (USA):Human kinetics, 2000, p. 225-246.

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

ENDLICH, PW; FIRMES, LB; GONÇALVES, WL; GOUVEA, SA; MOYSÉS, MR; BISSOLI, NS; REIS, AM; ABREU, GR. Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats. *Peptides*, v. 32, nº 8, p. 1706-1712, 2011.

FALKENSTEIN, E; TILLMANN, HC; CHRIST, M; FEURING, M; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*, v. 52, nº 4, p. 513-556, 2000.

FAR, HRM; AGREN, G; LINDQVIST, AS; MARMENDAL, M; FAHLKE, C; THIBLIN, I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate

to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *European Journal of Obstetrics & Gynecology, and Reproductive Biology*, v. 131, nº 2, p. 189-197, 2007.

FERNANDES, T; SOCI, UPR; OLIVEIRA, EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: MicroRNAs and molecular determinants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, nº 9, p. 836-847, 2011.

FINESCHI, V; BAROLDI, G; MONCIOTTI, F; PAGLICCI REATTELLI, L; TURILLAZZI, E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Archives of Pathology and Laboratorial Medicine*, v. 125, p. 253-255, 2001.

FLANAGAN, ET; BUCKLEY, MM; AHERNE, CM; LAINIS, F; SATTAR, M; JOHNS, EJ. Impact of cardiac hypertrophy on arterial and cardiopulmonary baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in anaesthetized rats. *Experimental physiology*, v. 93, nº 9, p. 1058-1064, 2008.

FLORA, DR; POTTER, LR. Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-A degradation. *Endocrinology*, v. 151, p. 2769-2776, 2010.

FONTANA, K; CAMPOS, GER; STARON, RS; CRUZ-HÖFLING, MA. Effects of anabolic steroids and high-intensity aerobic exercise on skeletal muscle of transgenic mice. *PLoS ONE*, v. 8, nº 11, p. 1-8, 2013.

FRANKENFELD, SP; OLIVEIRA, LP; ORTENZI, VH; REGO-MONTEIRO, ICC; CHAVES, EA; FERREIRA, AC; LEITÃO, AC; CARVALHO, DP; FORTUNATO, RS. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male wistar rats. *PLoS ONE*, v. 9, nº 9, p. 1-8, 2014.

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

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

GAVA, AL; FREITAS, FPS; MEYRELLES, SS; SILVA, IV; GRACELI, JB. Review gender-dependent effects of aging on the kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, p. 905-913, 2011.

GELMANN, P. Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, nº 13, p. 3001-3015, 2002.

GEREZ, JR; FREI, F; CAMARGO, ICC. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception*, v. 72, nº 1, p. 77-80, 2005.

GRINSPOON, S; CORCORAN, C; LEE, K; BURROWS, B; HUBBARD, J; KATZNELSON, L; WALSH, M; GUCCIONE, A; CANNAN, J; HELLER, H; BASGOZ, N; KLIBANSKI, A. Loss of lean body and muscle mass correlates with androgen levels in hypogonadal men with acquired immunodeficiency syndrome and wasting. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 81, nº 11, p. 4051-4058, 1996.

HAROON, J; FOUREAUX, G; MARTINS, AS; FERREIRA, AJ; REIS, AM; JAVED, Q. Gender differences in normal left ventricle of adult FVB/N mice due to

variation in interleukins and natriuretic peptides expression levels. *Cytokine*, v. 71, n° 1, p. 54-59, 2015.

HARRIS, PJ; THOMAS, D; MORGAN, TO. Atrial natriuretic peptides inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature*, v. 326, p. 697-698, 1987.

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

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

HENRY, JP; PEARCE, JW. The possible role of cardiac stretch receptors in the induction of changes in urine flow. *Journal of Physiology*, v. 131, n° 3, p. 572-594, 1956.

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

HOLTWICK, R; Van EICKELS, M; SKRYABIN, BV; BABA, HA; BUBIKAT, A; BEGROW, F; SCHNEIDER, MD; GARBERS, DL; KUHN M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylylcyclase-A. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n°9, p.1399-1407, 2003.

HONG, M; YAN, Q; TAO, B; BOERSMA, A; HAN, KK; VANTYGHM, MC; RACADOT, A; LEFEBVRE, J. Estradiol, progesterone and testosterone exposures

affect the atrial natriuretic peptide gene expression *in vivo* in rats. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, v. 373, p. 213-218, 1992.

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*, v. 40, p. 226-230, 2009.

IKEDA, SI; TAMURA, Y; KAKEHI, S; SANADA, H; KAWAMORI, R; WATADA, H. Exercise induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 473, N° 4, p. 947-952, 2016.

IMAIZUMI, T; TAKESHITA, A; HIGASHI, H; NAKAMURA, M. alpha-ANP alters reflex control of lumbar and renal sympathetic nerve activity and heart rate. *American Journal of Physiology*, v. 253, p. H1136-H1140, 1987.

IVY, JL. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Medicine*, v. 24, n° 5, p. 321-336, 1997.

JANKOWSKI, M; RACHELSKA, G; DONGHAO, W; MCCANN, SM; GUTKOWSKA, J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n° 20, p. 11765-11770, 2001.

JIN, J; YANG, W. Molecular regulation of hypothalamus–pituitary–gonads axis in males. *Gene*, v. 551, p. 15-25, 2014.

KALININE, E; ZIMMER, ER; ZENKI, KC; KALININE, I; KAZLAUCKAS, V; HAAS, CB; HANSEL, G; ZIMMER, AR; SOUZA, DO; MÜLLER, AP; PORTELA, LV.

Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. *Hormones and Behavior*, v. 66, n° 2, p. 383-392, 2014.

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

KISCH, B. Electron microscopy of the atrium of the heart I Guinea pig. *Experimental and Medical Surgery*, v. 14, n° 2-3, p. 99-112, 1956.

KISHIMOTO, I; ROSSI, K; GARBERS, DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylylcyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 2703-2706, 2001.

KLEIN, RM; MaCGILLIVRAY, BK; MCKENZIE, JC. Markers of cardiac hypertrophy. *Annals of New York Academy of Sciences*, v. 752, p. 210-217, 1995.

KNOWLES, JW; ESPOSITO, G; MAO, L; HAGAMAN, JR; FOX, JE; SMITHIES, O; ROCKMAN, HA; MAEDA, N. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *Journal of Clinical Investion*, v. 107, p. 975-984, 2001.

KOSHIYA, N; HUANGFU, D; GUYENET, PG. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Research*, v. 609, p. 174-184, 1993.

KRAYER, O. The history of the Bezold-Jarisch effect. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv fur Experimentelle Patologie und Pharmakologie*, v. 240, p. 361-368, 1961.

KRUK, J. physical activity in the prevention of the most frequente chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 8, p. 325-338, 2007.

KUHN, CM. Anabolic steroids. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 57, nº 7, p. 411-434, 2002.

KURTZ, A. Transmembrane signalling of atrial natriuretic peptide in rat renal juxtaglomerular cells. *Klinische Wochenschrift*, v. 64, p.37-41, 1986.

LACHANCE, D; GARCIA, R. Atrial Natriuretic Factor Release by Angiotensin II in the Conscious Rat. *Hypertension*, v. 11, p. 502-508, 1988.

Le PAGE, C; NOIREZ, P; COURTY, J; RIOU, B; SWYNGHEDAUW, B; BESSE, S. Exercise training improve functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Experimental Gerontology*, v. 44, p. 177-182, 2009.

LEVIN, ER; GARDNER, DG; SAMSON, WK. Natriuretic peptides. *New England Journal of Medicine*, v. 339, nº 5, p.321-328, 1998.

LI, L; YI-MING, W; LI, ZZ; ZHAO, L; YU, YS; LI, DJ; XIA, CY; LIU, JG; SU, DF. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*, v. 58, p. 196-201, 2008.

LIGHT, DB; CORBIN, JD; STANTON, BA. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Letters to Nature*, v. 344, p. 336-339, 1990.

LIMA, EM; NASCIMENTO, AM; BRASIL, GA; KALIL, IC; LENZ, D; ENDRINGER, DC; ANDRADE, TU; BISSOLI, NS. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: response to resistance training in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 93, nº 11, p. 985-991, 2015.

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.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n^o 4, p. 402-408, 2001.

LONGCOPE, C. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, v. 15, n^o 2, p. 213-228, 1986.

LORELL, BH; CARABELLO, BA. Left Ventricular Hypertrophy Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation*, v. 102, n^o 4, p. 470-479, 2000.

LUMIA, AR; MCGINNIS, MY. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. *Physiology and Behavior*, v. 100, n^o 3, p. 199-204, 2010.

MALARKEY, WB; STRAUSS, RH; LEIZMAN, DJ; LIGGETT, M; DEMERS, LM. Endocrine effects in female weight lifters who self-administer testosterone and anabolic steroids. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 165, n^o 5, p. 1385-1390, 1991.

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

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

MARÍN-GREZ, M; FLEMING, JT; STEINHAUSEN, M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*, v. 324, p. 473-476, 1986.

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

MARTINEZ, DG; NICOLAU, JC; LAGE, RL; TOSCHI-DIAS, E; De MATOS, LD; ALVES, MJ; TROMBETTA, IC; DIAS DA SILVA, VJ; MIDDLEKAUFF, HR; NEGRÃO, CE; RONDON, MU. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. *Hypertension*, v. 58, p. 1049-1056, 2011.

MARTINS, T; ROCHA e SILVA, A. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 22, p. 194-199, 1929.

McKIE, PM; CATALIOTTI, A; LAHR, BD; MARTIN, FL; REDFIELD, MM; BAILEY, KR; RODEHEFFER, RJ; BURNETT, JC Jr. The prognostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for death and cardiovascular events in healthy normal and stage A/B heart failure subjects. *Journal of American College of Cardiology*, v. 55, p. 2140-2147, 2010.

MEDEIROS, ARS; LAMAS, AZ; CALIMAN, IF; DALPIAZ, PLM; FIRMES, LB; ABREU, GR; MOYSÉS, MR; LEMOS, EM; REIS, AM; BISSOLI, NS. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. *Regulatory Peptides*, v. 179, p. 55-60, 2012.

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

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

MILLER, WL. *Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis*. *Endocrinal Reviews*, v. 9, nº 3, p. 295-318, 1988.

MILLER, WL; AUCHUS, RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, v. 32, nº 1, p. 81-151, 2011.

MIMURA, J; YUASA, F; YUYAMA, R; KAWAMURA, A; IWASAKI, M; SUGIURA, T; IWASAKA, T. The effect of residential exercise training on baroreflex control of heart rate and sympathetic nerve activity in patients with acute myocardial infarction. *Chest*, v. 127, p. 1108-1115, 2005.

MISONO, KS; GRAMMER, RT; FUKUMI, H; INAGAMI, T. Rat atrial natriuretic factor: Isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, nº 2, p. 444-451, 1984.

MOZAFFARIAN, D; BENJAMIN, EJ; GO, AS; ARNETT, DK; BLAHA MJ; CUSHMAN, M; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, v. 133, p. e38-e360, 2016.

MONTISCI, M; EI MAZLOUM, R; CECCHETTO, G; TERRANOVA, C; FERRARA, SD; THIENE, G; BASSO, C. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: Morphological and toxicological findings in four fatal cases. *Forensic Science International*, v. 217, nº 1-3, p. e12-e17, 2012.

MORAES, MR; BACURAU, RF; CASARINI, DE; JARA, ZP; RONCHI, FA; ALMEIDA, SS; HIGA, EM; PUDO, MA; ROSA, TS; HARO, AS; BARROS, CC;

PESQUERO, JB; WÜRTELE, M; ARAÚJO, RC. Chronic conventional resistance exercise reduces blood pressure in stage 1 hypertensive men. *Journal of Strength Conditional Research*, v. 26, nº 4, p.1122-1129, 2012a.

MORAES, MR; BACURAU, RF; SIMOES, HG; CAMPBELL, CS; PUDO, MA; WASINSKI, F; PESQUERO, JB; WÜRTELE, M; ARAÚJO, RC. Effect of 12 weeks of resistance exercise on post-exercise hypotension in stage 1 hypertensive individuals. *Journal of human hypertension*, v. 26, nº 9, p.533-539, 2012b.

MOUBARAK, M; MAGAUD, C; SALIBA, Y; CHATELIER, A; BOIS, P; FAIVRE, JF; FARES, N. Effects of atrial natriuretic peptide on rat ventricular fibroblasts during differentiation into myofibroblasts. *Physiological Research*, v. 64, nº 4, p. 495-503 2015.

NAKAO, K; ITOH, H; KAMBAYASHI, Y; HOSODA, K; SAITO, Y; YAMADA, T; MUKOYAMA, M; ARAI, H; SHIRAKAMI, G; SUGA, S; JOUGASAKI, M; OGAWA, Y; INOUE, K; IMURA, H. Rat Brain Natriuretic Peptide. *Hypertension*, v. 15, p. 774-778, 1990.

NASCIMENTO, AM; LIMA, EM; BRASIL, GA; CALIMAN, IF; SILVA, JF; LEMOS, VS; ANDRADE, TU; BISSOLI, NS. Serca2a and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 301, p. 22-30, 2016.

NETO, WK; GAMA, EF; ROCHA, LY; RAMOS, CC; TAETS, W; SCAPINI, KB; FERREIRA, JB; RODRIGUES, B; CAPERUTO, E. Effects of testosterone on lean mass gain in elderly men: systematic review with meta-analysis of controlled and randomized studies. *Age*, v. 37, p. 1-10, 2015.

NEVES, VJ; TANNO, AP; CUNHA, TS; FERNANDES, T; GUZZONI, V; Da SILVA, CA; OLIVEIRA, EM; MOURA, MJCS; MARCONDES, FK. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β -adrenergic receptors. *Life Sciences*, v. 92, n^o 20-21, p. 1029-1035, 2013.

NORTON, GR; TRIFUNOVIC, B; WOODIWISS, AJ. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *European Journal of Applied Physiology*, v. 81, n^o 4, p. 310-316, 2000.

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

PEREIRA, VM; COSTA, APR; ROSA-e-SILVA, AAM; VIEIRA, MAR; REIS, AM. Regulation of steroidogenesis by atrial natriuretic peptide (ANP) in the rat testis: Differential involvement of GC-A and C receptors. *Peptides*, v. 29, p. 2024-2032, 2008.

PERRY, PJ; LUND, BC; DENINGER, MJ; KUTSCHER, EC; SCHNEIDER, J. Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey of drug utilization. *Clinical Journal of Sports Medicine*, v. 15, p. 326-330, 2005.

PETERSSON, A; GARLE, M; HOLMGREN, P; DRUID, H; KRANTZ, P; THIBLIN, I. Toxicological findings and manner of death autopsied users of anabolic androgenic steroids. *Drug and alcohol dependence*, v. 81, p. 241-249, 2006.

PIRATELLO, AC; MORAES-SILVA, I; PAULINI, J; SOUZA, PR; SIRVENTE, R; SALEMI, V; FLUES, K; MOREIRA, ED; MOSTARDA, C; CUNHA, T; CASARINI, DE; IRIGOYEN, MC. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. *Animals*, v. 65, nº 12, p. 1345-1350, 2010.

POTTER, LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS Journal*, v. 278, p. 1808-1817, 2011.

POTTER, LR; ABBEY-HOSCH, S; DICKEY, DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Reviews*, v. 27, nº 1, p. 47-72, 2006.

POZZI, R; FERNANDES, KR; De MOURA, CFG; FERRARI, RAM; FERNANDES, KPS; RENNO, ACM; RIBEIRO, DA. Nandrolone decanoate induces genetic damage in multiple organs of rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 64, nº 3, p. 514-518, 2013.

RAINER, Q; SPEZIALI, S; RUBINO, T; DOMINGUEZ-LOPEZ, S; BAMBICO, FR; GOBBI, G; PAROLARO, D. Chronic nandrolone decanoate exposure during adolescence affects emotional behavior and monoaminergic neurotransmission in adulthood. *Neuropharmacology*, v. 83, p. 79-88, 2014.

REED, BG; CARR, BR. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. In: De GROOT LJ, BECK-PECCOZ P, CHROUSOS G, et al. (Ed). *Endotext: Comprehensive Free Online Endocrinology Book*. South Dartmouth (MA):MDText.com, Inc., 2000-2015.

RIBEIRO, F; ALVES, AJ; TEIXEIRA, M; MIRANDA, F; AZEVEDO, C; DUARTE, JA; OLIVEIRA, J. Exercise training increases interleukin-10 after an acute myocardial

infarction: a randomised clinical trial. *International Journal of Sports Medicine*, v. 33, p. 192-198, 2012.

RIEZZO, I; DiPAOLO, 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 β 1 receptor expression in CD1 mice. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 12, n° 2, p. 275-284, 2011.

RIEZZO, I; TURILLAZZI, E; BELLO, S; CANTATORE, S; CERRETANI, D; DiPAOLO, M; FIASCHI, AI; FRATI, P; NERI, M; PERETTI, M; FINESCHI, V. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidney of CD1 treated mice, *Toxicological and Applied Pharmacology*, v. 208, p. 97-106, 2014.

RODRIGUES, B; LIRA, FS; CONSOLIM-COLOMBO, FM; ROCHA, JA; CAPERUTO, EC; De ANGELIS, K; IRIGOYEN, MC. Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ROMERO, M; CANIFFI, C; BOUCHET, G; ELESGARAY, R; LAUGHLIN, MM; TOMAT, A; ARRANZ, C; COSTA, MA. Sex differences in the beneficial cardiac effects of chronic treatment with atrial natriuretic Peptide in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE*, v.8, n° 8, p. 1-8, 2013.

RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. *Pharmacological Reviews*, v. 44, p. 481-602, 1992.

SCHIEBINGER, R; GREENING, K. Interaction between stretch and hormonally stimulated atrial natriuretic peptide secretion. *American Journal of Physiology*, v. 262, p. H78-H83, 1992.

SCHWEDA, F; KURTZ, A. Regulation of Renin Release by Local and Systemic Factors. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 161, p. 1-44, 2009.

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

SHANSHAN, P; YAN, Z; AIYUN, L; CHEN, P. Effect of exercise on gene expression of atrial natriuretic peptide receptor of kidney. *Life Science*, v. 76, p. 1921-1928, 2005.

SHEPHERD, JT; MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 105, p. 3-100, 1986.

SIMPSON, ER; MISSO, M; HEWITT, KN; HILL, RA; BOON, WC; JONES, ME; KOVACIC, A; ZHOU, J; CLYNE, CD. Estrogen: The Good, the Bad, and the Unexpected. *Endocrine Reviews*, v. 26, nº 3, p. 322-330, 2005.

SMITH, ML; HUDSON, DL; GRAITZER, HM; RAVEN, PB. Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 21, nº 1, p. 40-44, 1989.

SOLAKOVIC, S; TOTIC, D; VUKAS, H; DJEDOVIC, M. Hidden danger of irrational abusing illegal androgenic-anabolic steroids in recreational athletes age under 35 in Bosnia & Herzegovina. *Medical Archives: Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*, v. 69, nº 3, p. 200-202, 2015.

SOUZA, RR; CALDEIRA, CAV; CARBONE, PO; PIANCA, EV. Influence of glutamine on the effect of resistance exercise on cardiac ANP in rats. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*, v. 37, p. 74-79, 2015.

STERGIOPOULOS, K; BRENNAN, JJ; MATHEWS, R; SETARO, JF; KORT, S. Anabolic steroids, acute myocardial infarction and polycythemia: a case report and review of the literature. *Vascular Health and Risk Management*, v. 4, nº 6, p. 1475-1480, 2008.

SUDOH, T; KANGAWA, K; MINAMINO, N; MATSUO, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, v. 332, nº 6159, p. 78-81, 1988.

SUDOH, T; MINAMINO, N; KANGAWA, K; MATSUO, H. C-Type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 168, nº 2, p. 863-870, 1990.

SULLIVAN, ML; MARTINEZ, CM; GENNIS, P; GALLAGHER, EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 41, nº 1, p. 1-15, 1998.

SUMAN, OE; HASTEN, D; TURNER, MJ; RINDER, MR; SPINA, RJ; EHSANI, AA. Enhanced inotropic response to dobutamine in strength-trained subjects with left ventricular hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, v. 88, p. 534-539, 2000.

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

TANDON, OP; CHINTALA, R. Hypothalamo-pituitary-gonadal axis in control of female reproductive cycle. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 45, nº 4, p. 395-407, 2001.

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

THIBLIN, I; MOBINI-FAR, H; FRISK, M. Sudden unexpected death in a female fitness athlete, with a possible connection to the use of anabolic androgenic steroids (AAS) and ephedrine. *Forensic Science International*, v. 184, nº 1-3, p. 7-11, 2009.

THIBLIN, I; PETERSSON, A. Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: a review, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 19, p. 27-44, 2005.

THOMPSON, D; KARPE, F; LAFONTAN, M; FRAYN, K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiological Reviews*, v. 92, p. 157-191, 2012.

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

TOUKOLA, T; HOOKANA, E; JUNTILA, J; KAIKKONEN, K; TIKKANEN, J; PERKIÖMÄKI, J; KORTELAINE, M; HUIKURIA, HV. Sudden cardiac death during physical exercise: Characteristics of victims and autopsy findings. *Annals of medicine*, v. 47, 2015.

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

UGGERE, TA; ABREU, GR; SAMPAIO, KN; CABRAL, AM; BISSOLI, NS. 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, nº. 469-604, p. 589-594, 2000.

Van DER VIES, J. Implications of basic pharmacology in the therapy with esters of nandrolone. *Acta Endocrinologica: Supplementum*, v. 271, p. 38-44, 1985.

Van DER VIES, J. On the Mechanism of Action of Nandrolone Phenylpropionate and Nandrolone Decanoate in Rats. *Acta Endocrinologica*, v. 49, nº 2, p. 271-282, 1965.

VASCONSUELO, A; PRONSATO, L; RONDA, AC; BOLAND, R; MILANESI, L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*, v. 76, nº 12, p. 1223-1231, 2011.

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

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

WANG, TJ; LARSON, MG; LEVY, D; BENJAMIN, EJ; LEIP, EP; WILSON, PWF; VASAN, RS. Impact of Obesity on Plasma Natriuretic Peptide Levels. *Circulation*, v. 109, p. 594-600, 2004.

WEINER, RB; BAGGISH, AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Progress in cardiovascular diseases*, v. 54, nº5, p. 380-386, 2012.

WHITE, JP; GAO, S; PUPPA, MJ; SATO, S; WELLE, SL; CARSON, J.A. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Molecular Cellular Endocrinology*, v. 365, p. 174–186, 2013.

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

ZABAROVSKAJA, S; HAGE, C; LINDE, C; DAUBERT, J; DONAL, E; GABRIELSEN, A; MELLBIN, L; LUND, LH. Adaptive cardiovascular hormones in a spectrum of heart failure phenotypes. *International journal of cardiology*, v. 189, p. 6-11, 2015.

ZANCHETTI, A; MANCIA, G. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension*, v. 18, p. 13-21, 1991.

ZOTTI, M; TUCCI, P; COLAIANNA, M; MORGESE, MG; MHILLAJ, E; SCHIAVONE, S; SACACCIANOCE, S; CUOMO, V; TRABACE, L. Chronic

nandrolone administration induces dysfunction of the reward pathway in rats.
Steroids, v. 79, p. 7-13, 2014.

8 ANEXOS

Life Sciences 137 (2015) 65–73



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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

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



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2015
Received in revised form 28 May 2015
Accepted 3 July 2015
Available online 10 July 2015

Keywords:

Nandrolone decanoate
Cardiovascular system
ANP
Resistive training
Sex hormones

ABSTRACT

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

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

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

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

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

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

Serca2a and Na⁺/Ca²⁺ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2015

Revised 16 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 10 April 2016

Keywords:

Nandrolone decanoate

Resistive exercise

Left ventricular hypertrophy

Cardiac function

SERCA2a

NCX

ABSTRACT

Anabolic-androgenic steroids are misused, including by women, but little is known about the cardiovascular effects of these drugs on women. Aim: To evaluate the effects of nandrolone decanoate (ND) and resistive physical exercise on cardiac contractility in young female rats. Main methods: Female Wistar rats were separated into 4 groups: C (untrained animals); E (animals were submitted to resistance exercise by jumping in water 5 times per week); ND (animals were treated with ND, 20 mg/kg/week for 4 weeks); and NDE (trained and treated). The haemodynamic parameters (+dP/dt_{max} – dP/dt_{min} and Tau) were assessed in the left ventricle. The heart was collected for histological analyses and collagen deposition. The gastrocnemius muscle was weighed, and hypertrophy was assessed by the ratio of their weights to gastrocnemius/tibia length. The expression of calcium handling proteins was measured by western blot analysis. Results: ND treatment and physical exercise increased cardiac contractility and relaxation. In addition, ND promoted increases in phospholamban phosphorylated (p-PLB) and isoforms of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2a) expression, while resistance exercise increased the phosphorylation of PLB and expression of Na⁺/Ca²⁺ exchangers (NCX). Cardiac hypertrophy and collagen deposition were observed after ND treatment. Conclusion: Regulatory components of cytosolic calcium, such as SERCA2a and p-PLB, play important roles in modulating the contractility and relaxation effects of ND in females.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.