

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

VANDER JOSÉ DAS NEVES

**ANÁLISE DA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELA
ASSOCIAÇÃO DE ANABOLIZANTE A TREINAMENTO
FÍSICO RESISTIDO DE ALTA INTENSIDADE, EM RATOS.**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutor em Odontologia, na área
de concentração Fisiologia Oral.**

Orientadora: Prof^a Dra. Fernanda Klein Marcondes

**Este exemplar corresponde à versão
final da Tese defendida pelo aluno, e
orientado pela Professora Doutora
Fernanda Klein Marcondes.**



Assinatura do Orientador

PIRACICABA 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

N414a

Neves, Vander José das, 1975-

Análise da hipertrofia cardíaca induzida pela associação de anabolizante a treinamento físico resistido de alta intensidade, em ratos / Vander José das Neves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Nandrolona. 2. Genes. 3. Pressão arterial. 4. Eletrocardiograma. I. Marcondes, Fernanda Klein, 1970- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of cardiac hypertrophy induced by nandrolone and physical training of high intensity in rats

Palavras-chave em Inglês:

Nandrolone

Genes

Blood pressure

Eletrocardiogram

Área de concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Fernanda Klein Marcondes [Orientador]

Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Carlos Alberto da Silva

Cláudio Alexandre Gobatto

Maria Luiza Ozores Polacow

Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato VANDER JOSÉ DAS NEVES aprovado.

Prof. Dra. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Prof. Dr. SÉRGIO EDUARDO DE ANDRADE PEREZ

Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA SILVA

Prof. Dr. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO

Prof. Dra. MARIA LUIZA OZORES POLACOW

DEDICO

Aos meus Pais, **Geralda e Vicente**, por terem me dado a vida, força e coragem.

Aos meus irmãos **Edmilson e Edson**, por todos os incentivos na busca desta conquista.

Aos meus lindos sobrinhos **Jaciara, Luís Fernando e Samuel**, por sempre me transmitirem a idéia de que *todo cientista deveria ter a curiosidade e a vontade das crianças*.

Aos meus tios **Sebastião e Elza Carvalho** por tudo de bom que fizeram por mim.

Aos meus grandes amigos fisiologistas **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes** (minha orientadora), **Eduardo Kurihara, Gustavo Gameiro, Andres Marlo e Rogério Falheiros**, por terem facilitado minha vida em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me propiciar a ciência como motivo profissional.

Aos meus familiares, meu pai Vicente Fernandes Neves, minha mãe Geralda de Carvalho Neves, meus irmãos Edmilson Fernandes de Carvalho Neves e Edson Fernandes de Carvalho Neves por todo apoio ao longo desta caminhada.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – na pessoa do atual Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela oportunidade de ter realizado meu Doutorado nesta prestigiada instituição.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP – na pessoa do atual Diretor Jacks Jorge Júnior, pelo apoio incondicional durante a realização desta Tese.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP/UNICAMP, na pessoa da atual Chefe de Departamento Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, por me ter aberto as portas da pesquisa científica.

Aos Professores Dr. Pedro Duarte Novaes, Dra. Tatiana Cunha, Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, Dra. Ana Paula Tanno, Dra. Maria José Costa Sampaio Moura, Dra. Maria Cláudia Irigoyen, Dr. Carlos Silva, e aos colegas Vinicius Guzzoni, Tiago Fernandes, Fernanda Giordano por todas as colaborações, fundamentais para a realização desta Tese.

Às Professoras Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga e Cínthia Machado Tabchoury, por toda força e confiança durante o doutorado.

Aos amigos que me ajudaram em momentos difíceis: Rafaela Costa, Vinicius Guzzoni, Jorge Esquiche León, Luciana Yamamoto, Mário Romañach, Michelle Agostini, Marcelo

Marques, Fernanda Viviane Mariano, Doutor Raimundo Sant'Ana, Bete Sant'Ana, Gabriela Sant'Ana, Adriano Sant'Ana e Paula Sant'Ana.

Aos amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas: Feliciano, Eliete, Eliane, Elisa, Raquel e Érica, por todo apoio funcional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2007/08462-2), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 141315/2011-3), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, por ter despertado em mim a curiosidade do método científico, por todas as oportunidades que me conferiu e pela confiança em toda minha trajetória na pós-graduação. Agradeço por toda compreensão nos momentos difíceis durante meu mestrado e doutorado. Sem seu apoio eu não teria conseguido colher bons frutos. Sua amizade foi uma das grandes conquistas na minha vida. Sou muito grato por tudo que fez por mim. Muito obrigado Fernanda.

RESUMO

A associação entre o tratamento com o esteróide anabólico nandrolona e treinamento físico resistido de alta intensidade induziu hipertrofia cardíaca concêntrica, disfunção sistólica e diastólica em ratos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se esta hipertrofia seria patológica, por meio da análise da expressão gênica de marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (α -miosina de cadeia pesada (α -MHC), β -miosina de cadeia pesada (β -MHC), α -actina esquelética e peptídeo natriurético atrial). Outro objetivo deste estudo foi analisar o efeito da nandrolona associada ou não ao treinamento físico sobre a pressão arterial *in vivo*, a eletrofisiologia cardíaca, e a população de adrenoceptores β_1 (AR- β_1) e β_2 (AR- β_2) no átrio direito de ratos. Foram utilizados 88 ratos Wistar, divididos em quatro grupos experimentais: não treinado+veículo (NTV), treinado+veículo (TV), não treinado+nandrolona (NTN), treinado+nandrolona (TN). Os animais foram tratados por 6 semanas com veículo propilenoglicol (0,2 mL/Kg) ou decanoato de nandrolona (5 mg/Kg), i.m. 2x/semana. O treinamento foi realizado por saltos em água com sobrecarga de peso variando de 50-70% do peso corporal, 5 dias/semana, por 6 semanas. Na sétima semana, os animais foram mortos por decapitação e o coração foi isolado para análise dos marcadores de hipertrofia cardíaca e da população de adrenoceptores β atriais. Em outros animais, submetidos aos mesmos tratamentos, foi analisada a pressão arterial 1x/semana e o eletrocardiograma foi realizado no fim do período experimental. Os resultados foram comparados por ANOVA bifatorial seguido por teste de Tukey e a pressão arterial por Análise de Variância com Medidas Repetidas e com Estrutura de Variância Auto-regressiva. A nandrolona diminuiu a expressão de α -MHC nos grupos NTN (26%) e TN (42,5%) em comparação ao grupo NTV. O treinamento diminuiu a expressão de β -MHC nos grupos TV (59,5%) e TN (22,7%) comparados ao grupo NTV. Apenas no grupo TN houve aumento de α -actina esquelética (117,3%) e peptídeo natriurético atrial (114%) comparado a NTV. Nos grupos TV e TN, a pressão arterial sistólica, média e diastólica diminuiu em comparação aos respectivos grupos não treinados. A frequência cardíaca diminuiu nos grupos TV e TN nas semanas 5 e 6 em comparação aos respectivos grupos não treinados. A nandrolona induziu aumento da pressão arterial sistólica nos grupos NTN

e TN na quinta semana de tratamento em comparação com a primeira e segunda semanas. No eletrocardiograma, a nandrolona prolongou o intervalo QTc em 3,7% no grupo NTN e 2,7% no TN em comparação aos respectivos grupos tratados com nandrolona. A nandrolona induziu aumento de 50,1% na população de AR- β_1 no grupo NTN e 75,6% no TN em comparação ao NTV, e também induziu aumento de 66,5% na população de AR- β_2 no grupo NTN e 126,7% no TN em comparação ao NTV. Os resultados do presente trabalho mostram que a hipertrofia cardíaca induzida pela nandrolona, isoladamente, ou em associação ao treinamento físico é patológica, e sugerem que as alterações na população de adrenoceptores β podem representar um mecanismo compensatório aos efeitos desencadeados pela nandrolona sobre o miocárdio hipertrofiado.

Palavras-chave: Hipertrofia cardíaca, nandrolona, genes, pressão arterial, eletrocardiograma, ratos.

ABSTRACT

The nandrolone or its association with physical training induced concentric cardiac hypertrophy associated with systolic and diastolic dysfunction in the heart of rat. In this way, to complement these results, the objective of this study was to evaluate the influence of nandrolone and resistance training on cardiac hypertrophy, the gene expression of pathological cardiac hypertrophy markers (α -myosin heavy chain (α -MHC), β -myosin heavy chain (β -MHC), α -skeletal actin and atrial natriuretic peptide), blood pressure *in vivo*, cardiac electrophysiology, and the population of β 1-adrenoceptor (AR- β 1) and β 2 (β 2-AR) in right atrium of 88 Wistar rats, which were divided into four groups: non trained+vehicle (NTV), Trained+vehicle (TV), non trained+nandrolone (NTN), trained+nandrolone (TN). The animals were treated for 6 weeks with vehicle propylene glycol (0.2 mL/kg) or nandrolone decanoate (5 mg/kg), i.m. 2x/week. The training was carried out by jumping into water with overweight ranging from 50-70% of body weight, 5 days/week for 6 weeks. After sacrifice of animals, were performed the analysis of cardiac hypertrophy markers of β adrenoceptors population. In other animals underwent the same treatment, blood pressure was analyzed 1x/semana and electrocardiogram was performed at the end of trial period. The results were calculated by two-way ANOVA followed by Tukey test and blood pressure by Analysis of Variance with Repeated Measures of Structure of Self-regressive Variance. The results showed cardiac hypertrophy 9% higher in the TV group and 8% for NTN compared to NTV, and this effect was potentiated in TN group. The nandrolone decreased the expression of α -MHC in the NTN group (26%) and TN (42.5%), both compared to NTV. Training decreased the expression of β -MHC in TV group (in 59.5%) and TN (22.7%) compared to NTV. Only in the TN group, both α -skeletal actin (117.3%) and atrial natriuretic peptide (114%) were increased compared to NTV. In TV and TN groups, systolic, mean and diastolic blood pressures were decreased compared to the respective non trained groups. The heart rate decreased in the groups TV and TN in the weeks 5 and 6 in comparison to the respective groups NTV and NTN. The nandrolone increased systolic blood pressure in TN and NTN groups in the fifth week of treatment compared to the first and second weeks. The electrocardiogram analysis shown that

nandrolone prolonged QTc interval by 3.7% in the NTN group and 2.7% in TN compared to respective groups NTV and TV. The nandrolone induced an increase of 50.1% in the population of AR- β 1 on NTN group and 75.6% in TN compared to NTV, and also increased 66.5% in the β 2-AR population in the NTN group and 126,7% in TN compared to NTV. In conclusion, the results of this study confirm that cardiac hypertrophy induced by only nandrolone or in combination with physical training is pathological, and suggest that changes in the population of β -adrenoceptors are an attempt of right atrium to compensate the negative effects of nandrolone on the hypertrophied myocardium.

Keywords: Cardiac hypertrophy, nandrolone, genes, blood pressure, electrocardiogram, rats.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Animais	14
4.2. Delineamento Experimental	14
4.3. Treinamento Físico Resistido de Alta Intensidade.....	15
4.4. Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	16
4.5. Eletrocardiograma	17
4.6. Sacrifício dos Animais e Coleta das Amostras	17
4.7. Expressão dos Marcadores de Hipertrofia Cardíaca	18
4.7.1. Expressão Gênica do Peptídeo natriurético atrial (ANP), alfa-actina esquelética, alfa e beta miosina de cadeia pesada	18
4.7.2. Síntese de cDNA	19
4.7.3. Reação de polimerase em cadeia em tempo real.....	19
4.8. Western blot para avaliação da densidade de adrenoceptores do tecido atrial.....	21
4.9. Análise Estatística	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	43

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são compostos sintéticos, derivados da testosterona, muito utilizados na clínica médica, todavia, devido às propriedades anabólicas, maximizadas por alterações moleculares nestes compostos, eles têm sido também muito utilizados no meio esportivo (Kuhn, 2002) como forma de melhorar o desempenho atlético entre competidores e também em academias como forma de melhorar a aparência física (Tanner et al., 1995). Suas indicações terapêuticas estão associadas à deficiência hormonal masculina, deficiência no metabolismo protéico (Cunha et al., 2004), em casos de anemias (Berns et al., 1992), osteoporose (Gordon et al., 1999), queimaduras, politraumatismos e para pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Creutzberg & Schols, 1999). Todavia, o uso de doses supra-fisiológicas destes hormônios está relacionado a vários efeitos colaterais, tais como atrofia do tecido testicular, disfunção erétil, ginecomastia, engrossamento da voz e crescimento dos pelos em mulheres (Wu, 1997) e tumores hepáticos e de próstata (Yesalis, 1993).

Ao contrário dos efeitos benéficos apresentados pelo treinamento físico sobre o sistema cardiovascular, muitos estudos têm mostrado que o uso de EAA, isoladamente ou em associação com o treinamento físico, pode promover efeitos deletérios no sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca patológica associada a aumento do conteúdo de colágeno no ventrículo esquerdo (Tanno et al., 2011), alterações eletrocardiográficas (Stolt et al., 1999), aumento da pressão arterial (Gelfand & Wita, 1997), redução da resposta inotrópica mediada por receptores beta (Norton et al., 2000), inibição da produção de óxido nítrico endotelial na aorta torácica de ratos (Guzzoni, 2010), prejuízo no fluxo coronário e na perfusão cardíaca, além de aterosclerose e aumento do tônus simpático (Woodiwiss et al., 2000; Urhausen et al., 2004).

Os esteróides EAA podem ser utilizados de várias formas, seja por ingestão de comprimidos, por meio de selos de fixação na pele, ou por meio de injeção intramuscular de compostos líquidos (Ribeiro, 2000). No caso dos compostos injetáveis, o decanoato de nandrolona ou Deca Durabolin[®] é um dos mais utilizados por se tratar de uma preparação anabólica injetável com efeitos prolongados de até três semanas após injeção intramuscular

em humanos, além de ser o EAA mais disponível no mercado (Kutscher et al., 2002)

Em estudo anterior, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Tanno, 2007), foi demonstrado que o tratamento com nandrolona promoveu hipertrofia cardíaca concêntrica acompanhada por aumento do conteúdo de colágeno no ventrículo esquerdo do coração de ratos, independente do treinamento físico resistido de alta intensidade. Nas análises ecocardiográficas foram observados aumento na razão entre peso do ventrículo esquerdo por peso corporal e na razão entre massa do ventrículo esquerdo por peso corporal, além de aumento da espessura do septo interventricular no final da diástole e da espessura relativa da parede posterior do ventrículo esquerdo nos grupos tratados com nandrolona, treinados e não treinados. Estas alterações foram acompanhadas por diminuição do índice cardíaco nos grupos tratados com nandrolona, treinados ou não, indicando que o tratamento promoveu prejuízo na função sistólica do coração hipertrofiado. Nas análises ecocardiográficas da função diastólica, foi observada diminuição da velocidade de fluxo transmitral inicial e aumento no tempo de relaxamento ventricular isovolumétrico do ciclo cardíaco, indicando prejuízo também na função diastólica do coração de ratos tratados com nandrolona, independentemente do treinamento físico. Tais resultados, observados na estrutura e funções cardíacas, indicaram hipertrofia cardíaca concêntrica patológica causada por efeito da nandrolona, sem prejuízos funcionais no coração hipertrofiado por efeito apenas do treinamento físico. Em outro trabalho, também desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o treinamento físico induziu subsensibilidade à fenilefrina na aorta torácica de ratos, todavia a nandrolona foi capaz de cancelar esta subsensibilidade induzida pelo treinamento (Cunha et al., 2005a). Além disso, Guzzoni (2010) demonstrou que a nandrolona, isoladamente, ou em associação com o treinamento físico, foi capaz de diminuir a produção de óxido nítrico no endotélio da aorta torácica de ratos. Diante disso, nossa hipótese foi que a hipertrofia cardíaca patológica poderia promover alterações na expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca, aumento na pressão arterial *in vivo*, prolongamento do intervalo QTc na eletrofisiologia cardíaca e alterações na homogeneidade da população de adrenoceptores β_1 e β_2 no átrio direito do coração hipertrofiado.

Considerando nossa hipótese, o objetivo deste trabalho foi analisar os

mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca induzida pela associação de anabolizante com treinamento físico resistido de alta intensidade, em ratos, avaliando a expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca (α -miosina de cadeia pesada, β -miosina de cadeia pesada, α -actina esquelética e peptídeo natriurético atrial) por meio de reação de polimerase em cadeia em tempo real, avaliando a homogeneidade da população de adrenoreceptores β_1 e β_2 atriais por meio de western blot, a eletrofisiologia cardíaca por eletrocardiograma e a evolução da pressão arterial *in vivo* por meio de pletismografia de cauda.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA), hormônios sintéticos derivados da testosterona, têm sido utilizados por muitos atletas, de diferentes modalidades esportivas, para melhorar o rendimento em esportes profissionais e amadores. (Creutzberg & Schols, 1999; Cunha *et al.*, 2004). Atletas que utilizam os hormônios sintéticos, buscando melhora do desempenho atlético, geralmente associam o consumo de EAA ao treinamento de força ou ao exercício físico anaeróbico (Kuipers *et al.*, 1993; Grogan *et al.*, 2006; Johansen *et al.*, 2006).

Dentre os EAA, o decanoato de nandrolona é um dos mais utilizados mundialmente por se tratar de uma preparação anabólica injetável com ação prolongada, de até três semanas, após administração intramuscular em humanos (Kramer, 1990). O decanoato de nandrolona é um composto sintético modificado que, ao contrário da testosterona, não apresenta o radical metil na posição 19 da molécula e no lugar do grupo funcional hidroxila há um ácido decanóico. Após administração intramuscular, o decanoato de nandrolona sofre hidrólise no organismo, perde o ácido decanóico e então recupera o grupo funcional hidroxila, transformando-se no esteróide biologicamente ativo, a nandrolona (Tylicki *et al.*, 2007). Em comparação com a testosterona, a nandrolona apresenta maior ação anabólica e menor ação androgênica (Wilson, 1988). Isto se deve ao fato de que a dissociação de efeitos androgênicos e anabólicos parece estar associada com a presença ou ausência da enzima 5 α -redutase em tecidos contendo receptores androgênicos. Pela ação da 5 α -redutase, a nandrolona passa à 5 α -diidronandrolona, e essa se liga mais fracamente ao receptor androgênico do que à própria nandrolona. Nos músculos, onde há baixa atividade da enzima 5 α -redutase, a própria nandrolona interage com receptores para esteróides, produzindo efeitos anabólicos relativamente maiores (Celotti & Cesi, 1992). Isso explica os efeitos relativamente fortes da nandrolona nos tecidos destituídos de atividade da enzima 5 α -redutase comparado aos efeitos relativamente fracos nos tecidos com atividade 5 α -redutase, tanto em humanos quanto em animais de laboratório.

Estudos em animais de laboratório têm representado para a ciência uma importante ferramenta metodológica para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos

de diversas doenças, possibilitando o entendimento da evolução de patologias desde seus estágios iniciais até seus estágios mais avançados, além de propiciar o entendimento dos efeitos de diferentes intervenções farmacológicas sobre diferentes patologias. Neste contexto, ratos de laboratório têm nos permitido também obter melhores compreensões dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos efeitos colaterais causados pelo uso abusivo de EAA.

A utilização de doses supra-fisiológicas de EAA está associada a vários efeitos colaterais em humanos como atrofia do tecido testicular, tumores hepáticos e de próstata (Johnson, 1995; Yesalis, 1993), alterações no metabolismo lipídico (Kuipers *et al.*, 1991) e alterações de humor (Gruber & Pope, 2000), podendo até ocasionar suicídio em indivíduos com predisposição genética (Thiblin *et al.*, 1999). Com relação ao sistema cardiovascular, foram observadas alterações eletrocardiográficas (Stolt *et al.*, 1999), aumento de pressão arterial (Kuipers *et al.*, 1991; Gelfand & Wita, 1997), cardiomiopatia (Clark & Schofiels, 2005) e aumento da massa do ventrículo esquerdo associado a um incremento do tempo de duração da fase de relaxamento isovolumétrico do ciclo cardíaco em fisiculturistas usuários de EAA (Nottin *et al.*, 2006). Além disso, já foi observada hipertrofia cardíaca concêntrica associada a disfunção sistólica e diastólica e re-expressão de genes característicos da vida fetal no ventrículo esquerdo de ratos tratados com nandrolona (Tanno *et al.*, 2011). Ainda, Norton *et al.*, (2000) relataram a ocorrência de redução da resposta inotrópica mediada pelos adrenocetores beta em ratos. Woodiwiss *et al.* (2000) observaram que o tratamento com nandrolona diminuiu a complacência do miocárdio em ratos e Chaves *et al.* (2006) observaram que animais tratados com nandrolona não apresentaram aumento da atividade de enzimas antioxidantes em resposta ao exercício físico, um efeito negativo da nandrolona sobre um efeito benéfico do exercício físico na pressão intraventricular.

Em estudo realizado por Tanno (2007), alterações cardíacas também foram evidenciadas, em ratos de laboratório submetidos a 6 semanas de treinamento físico de alta intensidade, por saltos em água, e tratamento com alta dose de decanoato de nandrolona, com aumento na razão peso do coração/peso corporal em ratos treinados e tratados com veículo ou nandrolona, em relação aos respectivos grupos não treinados. Também foi observado, por análise histológica do ventrículo esquerdo, um aumento do conteúdo

tecidual de colágeno no músculo cardíaco após o uso de nandrolona, sendo este efeito maior em animais treinados e tratados com nandrolona (Tanno, 2007). Além disso, a avaliação por ecodopplercardiograma, 48 horas após a última sessão de treinamento físico, também evidenciou aumento na espessura do septo interventricular e diminuição do débito cardíaco, em ratos tratados com o EAA, sedentários e treinados, em relação aos respectivos grupos tratados com veículo. Estes achados indicavam a ocorrência de hipertrofia concêntrica não fisiológica por não ser acompanhada de melhora na eficiência do trabalho da bomba cardíaca (Tanno, 2007).

A hipertrofia cardíaca é um termo que significa aumento na massa ventricular em resposta ao estresse aplicado, além de ser um processo adaptativo que ocorre em resposta a uma série de estímulos fisiológicos e patológicos (Conrad *et al.*, 1991). A hipertrofia cardíaca fisiológica, também chamada de hipertrofia adaptada, decorre de estímulos intermitentes, tais como sobrecargas de trabalho impostas por exercícios físicos estáticos ou dinâmicos realizados por longos períodos, todavia, a hipertrofia cardíaca patológica (mal-adaptada) decorre de estímulos crônicos tais como hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, hiperatividade simpática e estenose da aorta (Oliveira *et al.*, 2006). Ambos os tipos de hipertrofia, devido às diferentes alterações estruturais que nelas ocorrem, podem também ser classificadas como hipertrofia cardíaca excêntrica (normalmente é uma hipertrofia fisiológica) ou concêntrica (podendo esta ser fisiológica ou patológica). No caso da hipertrofia cardíaca excêntrica, o crescimento dos cardiomiócitos acontece em decorrência da adição de sarcômeros em série, permitindo que a célula cardíaca aumente seu tamanho em comprimento, e na hipertrofia concêntrica ocorre adição de sarcômeros em paralelo, permitindo que a célula cardíaca aumente seu tamanho em diâmetro (Garcia & Incerpi, 2008). Todavia, a hipertrofia cardíaca concêntrica nem sempre é uma hipertrofia cardíaca patológica, podendo ser causada por sobrecargas hemodinâmicas tais como exercícios físicos resistidos dinâmicos ou isométricos. Esse tipo de hipertrofia não resulta em prejuízos funcionais para o miocárdio, tampouco promove a re-expressão de genes característicos da vida fetal que sejam considerados marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (Tanno *et al.*, 2011).

Na hipertrofia cardíaca patológica, a qual geralmente é do tipo concêntrica,

observa-se, diminuição dos diâmetros da câmara ventricular esquerda, além de aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo e na espessura do septo interventricular no final da diástole, bem como redução na amplitude de contração da fibra muscular, podendo esta levar a uma insuficiência cardíaca (Hart, 2003; Conrad *et al.*, 1991). Esse tipo de hipertrofia pode aumentar a duração do tempo de relaxamento do ventrículo esquerdo e provocar alterações no metabolismo do cálcio (Nadal-Ginard & Mahdavi, 1989; Parker & Schneider, 1991; Chien *et al.*, 1991), além de promover alterações na expressão gênica de proteínas não contráteis e contráteis, como o peptídeo natriurético atrial (ANP), α -actina esquelética e beta-miosina de cadeia pesada (β -MCP).

Em resposta a diversos estímulos (hormonal, sobrecarga de pressão e volume, hipertensão arterial, genéticos, etc), que induzem hipertrofia patológica, ocorre a re-expressão do ANP nas células ventriculares, o que representa a reprogramação de um gene embrionário na hipertrofia cardíaca. Supõe-se que o ANP possa participar da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia cardíaca, embora o significado fisiológico da expressão aumentada do ANP no ventrículo esquerdo permaneça desconhecido. A expressão do gene que codifica o ANP ocorre tanto no ventrículo quanto no átrio apenas durante o desenvolvimento embrionário, porém, logo após o nascimento, a expressão do gene do ANP é diminuída no ventrículo e mantida no átrio ao longo da vida adulta (Silva & Krieger, 2000). Em situações normais, no adulto, o ANP é produzido somente pelo átrio em resposta ao aumento de volume do líquido extracelular e da pressão atrial. Este peptídeo, ao ser secretado pelo átrio, exerce várias funções, mas sua principal ação é a de relaxar a musculatura lisa vascular, resultando em vasodilatação e diminuição da resistência vascular periférica total. No rim, esta vasodilatação resulta em maior excreção de sódio e água, e como consequência, o volume do líquido extracelular e o volume sanguíneo são diminuídos e levam a uma diminuição na pressão arterial (Costanzo, 1999). Além do ANP, a re-expressão do gene da α -actina esquelética no miocárdio hipertrofiado é um indicativo muito bem aceito de que a hipertrofia cardíaca é patológica. Durante o desenvolvimento embrionário dos cardiomiócitos, ocorre a co-expressão de α -actina esquelética e α -actina cardíaca, porém, no final do desenvolvimento embrionário, passa a predominar o tipo α -actina cardíaca, a qual persiste ao longo de toda a vida.

Todavia, a expressão padrão destas isoformas de actina é altamente influenciada por condições patológicas, de modo que o acúmulo de mRNA para α -actina esquelética passa a ser então observado em situações patológicas no coração hipertrofiado (Driesen et al., 2009).

Além da re-expressão de genes de proteínas não contráteis no miocárdio hipertrofiado, mudanças na composição de proteínas contráteis também ocorrem e este fato determina alterações na capacidade contrátil do miocárdio, podendo levar a diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros (Oliveira & Krieger, 2002). As proteínas contráteis estão organizadas em filamentos finos de actina e grossos de miosina na unidade contrátil do miocárdio. No ventrículo da maioria dos mamíferos, inclusive do homem, já foram identificados dois tipos de miosina de cadeia pesada (MCP), α e β . A α -MCP apresenta maior atividade ATPásica e, portanto, está relacionada a uma maior velocidade de encurtamento dos sarcômeros, enquanto a β -MCP apresenta menor atividade ATPásica e, portanto, está relacionada a uma menor velocidade de encurtamento dos sarcômeros (Franchini, 2001). As alterações hemodinâmicas que ocorrem após o nascimento são capazes de promover regulações na expressão destas proteínas. Durante a vida fetal, a grande maioria dos mamíferos expressa predominantemente a β -MCP no ventrículo, porém, em mamíferos pequenos (rato e coelho), imediatamente antes do parto, ocorre um “upregulation” da α -MCP, que passa a corresponder à isoforma dominante durante toda a vida adulta. Mas a distribuição destas isoformas de proteínas contráteis pode ser modificada em resposta a sobrecargas de trabalho, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Oliveira & Krieger, 2002). Por este motivo, muita atenção tem sido dada no meio científico para as modificações relacionadas à expressão dos genes da α -MCP e da β -MCP no que diz respeito à hipertrofia cardíaca. Em casos de hipertrofia cardíaca fisiológica já foram demonstrados aumentos na atividade da ATPase miosínica, secundário a um aumento na expressão da isoforma α -MCP, levando a uma melhora da função sistólica no coração de ratos treinados por natação (Schaible & Scheuer, 1979). Nesta espécie, com predomínio da isoforma α -MCP e alta atividade ATPase miosínica, uma sobrecarga patológica como coarctação da aorta ou hipertensão arterial, resulta em rápida mudança do padrão α -MCP para a isoforma β -MCP, em questão de apenas dois a três dias, o que

representa a re-expressão de um fenótipo fetal associado com a diminuição da ATPase miosínica no miocárdio hipertrofiado (Oliveira & Krieger, 2002).

A re-expressão do gene do ANP no ventrículo esquerdo e as alterações da expressão da β -MCP e da α -actina esquelética podem ser consideradas critérios que podem distinguir estímulos simplesmente tróficos, que aceleram o crescimento normal, como o treinamento físico, de estímulos que são fundamentalmente hipertróficos, indicando o começo de uma resposta patológica (Izumo *et al.*, 1988; Chien *et al.*, 1991; Krieger, 1995). Este conjunto de alterações começa a fazer parte do quadro das características da hipertrofia cardíaca patológica, determinando as modificações morfológicas, estruturais, bioquímicas e genéticas do miocárdio hipertrofiado, como ocorre na hipertensão. Estudos com hipertrofia cardíaca induzida por treinamento de natação (Scheinowitz *et al.*, 2003) e corrida (Jin *et al.*, 2000; Machida *et al.*, 2000) em animais experimentais, têm mostrado uma expressão diferente, destes genes, da encontrada na hipertrofia patológica. Scheinowitz *et al.*, (2003), por exemplo, encontraram uma diminuição na expressão da β -MCP no coração de ratos treinados com natação por duas semanas de treinamento, mas esta redução não foi significativa após 6 semanas de treinamento, contrariando o que ocorre na hipertrofia patológica, que é um aumento na expressão deste gene. No treinamento em esteira, não foi encontrada alteração na expressão da β -MCP (Jin *et al.*, 2000; Machida *et al.*, 2000).

O uso de doses supra-fisiológicas de EAA tem sido associado a aumentos na pressão arterial sistólica e diastólica em humanos (Grace *et al.*, 2003), e aumentos crônicos da pressão arterial estão associados a prejuízos da função cardíaca em longo prazo (Kannel, 1977). Por outro lado, o treinamento físico produz vários efeitos benéficos bastantes conhecidos sobre o sistema cardiovascular. Muitos estudos mostram, por exemplo, diminuição na frequência cardíaca tanto de repouso quanto em trabalhos com cargas submáximas, indicando que para igual carga de trabalho, há menor gasto energético pelo coração e melhora na sua eficiência (Stone *et al.*, 1991; Stratton *et al.*, 1994).

O treinamento físico, de qualquer natureza, ele se caracteriza por retirar o organismo de sua homeostase, implicando no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada e do organismo como um todo (Brum *et al.*, 2004). O exercício

físico realizado regularmente provoca importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular. Os efeitos agudos imediatos, que ocorrem em associação direta com a sessão de exercício físico, podem ser exemplificados por aumento do débito cardíaco e da pressão arterial sistólica, que aumenta diretamente na proporção do aumento do débito cardíaco. Já a pressão arterial diastólica reflete a eficiência do mecanismo vasodilatador local dos músculos em atividade, que é tanto maior quanto maior for a densidade capilar local (Pássaro & Godoy, 1996; Monteiro & Filho, 2004). Quando realizados de maneira freqüente e regular, os exercícios físicos promovem efeitos crônicos no sistema cardiovascular, cujos exemplos mais típicos são bradicardia relativa de repouso e hipertrofia fisiológica do ventrículo esquerdo, todavia, quando o exercício físico realizado é de alta intensidade, como ocorre no presente estudo, as respostas cardiovasculares desencadeadas ainda não estão totalmente esclarecidas (Barauna et al., 2005), principalmente no que se refere à associação entre treinamento físico resistido de alta intensidade e o uso de doses supra-fisiológicas de EAA.

Em estudo realizado por Rocha et al., (2007) foi demonstrado que, em ratos submetidos a um regime de treinamento de natação (5 vezes por semana, 60 minutos diários, durante 10 dias), de características aeróbicas, e tratados com decanoato de nandrolona (5mg/Kg, 2 vezes por semana), o EAA não cancelou a bradicardia de repouso promovida pelo exercício físico. Foi demonstrado também que os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média não foram estatisticamente diferentes entre os grupos por eles estudados. Rivera-Arce et al., (2006), demonstraram que infusão de EAA no hipotálamo dorsomedial de ratas Sprague-Dawley promove uma redução da pressão arterial sistólica. Em homens, já foram observadas elevações da pressão sistólica e diastólica como resultado da administração de altas doses de EAA (Riebe et al., 1992; Grace et al., 2003). Todavia, os dados relacionados na literatura em relação aos efeitos dos EAA na pressão arterial são muitas vezes contraditórios e não são conclusivos (Hartgens & Kuipers, 2004), carecendo de investigações complementares na tentativa de esclarecer as muitas divergências existentes, tanto em humanos quanto em animais de laboratório.

Cabe ressaltar que o protocolo de treinamento físico utilizado no presente estudo, por ser de alta intensidade, é um bom modelo aplicado em animais capaz mimetizar

situações que ocorrem com humanos em academias, nas quais há muitos jovens realizando exercícios sem respeitar seus limites físicos e, tantas vezes, associando seus treinamentos ao uso de doses supra-fisiológicas de EAA.

A hipertrofia cardíaca que ocorre em resposta a alguns protocolos de treinamento pode ser associada a arritmias cardíacas (Hart, 2003). Neste sentido, Stolt *et al.* (1999) descreveram que usuários de altas doses de esteróides anabólicos, que praticavam exercícios físicos resistidos, apresentaram hipertrofia ventricular esquerda associada a aumento do intervalo QT. O aumento deste intervalo predispõe à ocorrência de arritmias e morte súbita, e caracteriza a chamada síndrome do intervalo QT prolongado, e poderia estar relacionado a alterações no cronotropismo cardíaco (Schwartz *et al.*, 1991). O controle simpático da frequência cardíaca e da contratilidade vascular é feito por meio da interação das catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, com os adrenoceptores alfa (α) e beta (β) (Alquist, 1948). Atualmente aceita-se que existam três subgrupos de adrenoceptores: α_1 , α_2 e β , que diferem entre si quanto à seqüência de aminoácidos de sua estrutura proteica, quanto à afinidade a agonistas e antagonistas adrenérgicos, e quanto ao sistema de segundo mensageiro a que estão acoplados (Landsberg & Young, 1992; Bylund *et al.*, 1994; Brodde & Michel, 1999). No átrio direito de ratos, existe uma presença predominante de AR- β_1 (83%) e 17% de AR- β_2 (Molinoff *et al.*, 1981) e, de acordo com estudos funcionais, no átrio direito de ratos, o efeito cronotrópico das catecolaminas, em condições basais, é mediado por AR- β_1 (Juberg *et al.*, 1985). Porém, em situações de estresse, o subtipo β_2 passa também a participar do controle da função cronotrópica (Bassani & De Moraes, 1988; Nourani *et al.*, 1992). Snyder *et al.* (2006) sugeriram que alterações na homeostase, desencadeadas pelo exercício físico, podem causar alterações na funcionalidade e densidade dos AR- β_2 em função da disponibilidade das catecolaminas. Essas alterações, associadas ao fator patológico da hipertrofia cardíaca, também podem propiciar um aumento da pós-carga, aumento e alteração do controle da pressão e da viscosidade sanguínea (Namakanov *et al.*, 2005).

Neste contexto, no estudo anterior realizado em nosso laboratório (Tanno, 2007) também havia sido observada maior sensibilidade da resposta cronotrópica à noradrenalina e adrenalina, em resposta ao treinamento físico, por salto em água,

independente do tratamento com EAA. A análise de curvas concentração-efeito à noradrenalina e adrenalina, obtidas *in vitro*, na presença de antagonistas adrenérgicos, indicaram que o exercício físico e o tratamento com decanoato de nandrolona, isoladamente, pareciam induzir alteração na homogeneidade da população de AR- β (Tanno, 2007). Porém, para que pudéssemos complementar os dados anteriores de nosso laboratório, bem como identificar o tipo e grau de alteração na expressão de AR- β_1 e AR- β_2 no átrio direito cardíaco, realizamos o presente trabalho para estudar os efeitos do treinamento de força, em associação ou não com doses supra-fisiológicas do EAA decanoato de nandrolona sobre a hipertrofia cardíaca em ratos. Foram feitas análises de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca patológica no ventrículo esquerdo, foi analisada a pressão arterial *in vivo* por meio de pletismografia de cauda, a atividade elétrica cardíaca por meio de eletrocardiograma, bem como foram feitas análises de adrenoceptores beta no átrio direito do coração de ratos.

3. OBJETIVOS

Analisar os efeitos da associação de anabolizante e treinamento físico resistido de alta intensidade sobre a hipertrofia cardíaca em ratos.

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, alfa-miosina de cadeia pesada, beta-miosina de cadeia pesada, alfa-actina esquelética e peptídeo natriurético atrial no ventrículo esquerdo.
- Avaliar a população de adrenoceptores β_1 e β_2 no tecido atrial.
- Avaliar a eletrofisiologia cardíaca.
- Avaliar a evolução da pressão arterial *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 2 meses de idade, de padrão SPF (*Specific Pathogen Free*), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, alojados em gaiolas coletivas com 4 animais, no máximo, em sala climatizada (22 ± 2 °C) e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 6:00 h). Receberam, durante todo o período experimental, água e ração para ratos à vontade, em ambiente sanitariamente controlado. Todos os procedimentos utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo CEEA nº 944-1) de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

4.2. Delineamento Experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: Não treinado + veículo (NTV); Não treinado + nandrolona (NTN); Treinado + veículo (TV) e Treinado + nandrolona (TN). Os animais receberam injeções i.m. de veículo (propilenoglicol – 0,2 mL/Kg) ou de decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin® - 5 mg/Kg) (Norton et al., 2000; Cunha et al., 2005a, b), duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras) entre às 7:30 e 8:00 h (Tanno, 2007). Esta dose é equivalente às altas doses geralmente utilizadas por atletas: 600 mg/semana ou aproximadamente 8 mg/Kg/semana (Pope & Katz, 1988). As aplicações foram realizadas no músculo gastrocnêmio direito e esquerdo dos animais, alternadamente. O peso corporal dos animais foi determinado semanalmente, às segundas-feiras, antes da aplicação do veículo ou do decanoato de nandrolona. O treinamento físico resistido dos animais dos grupos treinados foi realizado no período da tarde sempre começando às 13:00 horas.

4.3. Treinamento físico resistido de alta intensidade

Os animais foram submetidos individualmente a sessões de saltos em um cilindro de PVC com 38 cm de profundidade da coluna de água (figura 1) e temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O período de adaptação ao meio líquido foi considerado do 1º ao 5º dia, com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal, e logo após foram realizadas sessões com número crescente de saltos e séries de acordo com o protocolo descrito por Rogatto (2001) e Cunha et al. (2005a, b). O treinamento físico resistido (Rogatto, 2001) consistiu de 30 sessões de saltos em meio líquido com sobrecarga de peso, 5 dias por semana, entre 13:00 e 15:00 h (tabela 1). Em cada sessão, foram realizadas 4 séries de 10 saltos. Entre as séries houve um intervalo de 30 segundos, durante o qual o animal foi retirado da água e mantido em repouso sobre um suporte. O treinamento foi realizado com sobrecarga progressiva de peso, até atingir a carga máxima de 70% do peso corporal do animal. A sobrecarga foi acoplada ao tórax dos animais através de um colete (Tanno, 2007) (figura 2). Após cada sessão de treinamento, os animais foram secados com toalha absorvente e mantidos por cerca de 30 minutos no laboratório, até ficarem completamente secos, quando foram transportados ao biotério de experimentação.

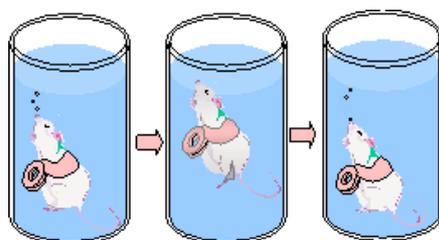


Figura 1: Cilindro de PVC para treinamento dos animais. Adaptada de Tanno et al., (2006).

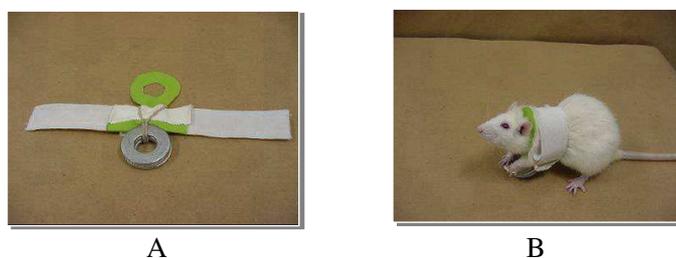


Figura 2: Colete de sobrecarga (A) e acoplamento ao tórax do animal (B).

Tabela 1 – Protocolo de treinamento físico de alta intensidade.

Dia de treinamento	Treinamento	Sobrecarga (% Peso corporal)
1°	2 séries de 5 saltos	50
2°	3 séries de 5 saltos	50
3°	4 séries de 5 saltos	50
4°	4 séries de 7 saltos	50
5°	4 séries de 9 saltos	50
6° ao 15°	4 séries de 10 saltos	50
16° ao 25°	4 séries de 10 saltos	60
26° ao 30°	4 séries de 10 saltos	70

4.4. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Durante todo o período experimental, uma vez por semana, foi verificada a pressão arterial dos animais por meio da conexão de um pletismógrafo (BP-2000 Blood Pressure Analysis SystemTM) à cauda dos animais (Krege et al., 1995), em sala com isolamento acústico e diminuição de quaisquer fontes de ruído que pudessem interferir nesta avaliação. Os ratos foram retirados do biotério e mantidos por 30 minutos no laboratório de experimentação para que pudessem se adaptar ao ambiente. Dois ratos, de grupos alternados, foram colocados no aparelho, cada um dentro de um compartimento retangular adequado ao tamanho do animal, onde permaneceram por 5 minutos sobre uma plataforma aquecida a 36 °C e com a cauda já conectada ao “cuff” do aparelho. Após 5 minutos de adaptação do animal ao aparelho, este foi acionado e as medidas de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram coletadas. Em cada troca de animal cada compartimento retangular foi lavado com sabão neutro e secado para evitar que os odores liberados pelos ratos anteriormente analisados pudessem interferir nas análises dos ratos subsequentes. As análises foram realizadas uma vez por semana entre 8:00 e 12:00 h.

4.5. Eletrocardiograma (ECG)

Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento físico, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico 40 mg/Kg de peso corporal (THIOPENTAX – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, Brasil). A análise eletrocardiográfica foi realizada por um eletrocardiógrafo FUMBEC acoplado a um *software Heart Ware* adaptado para avaliação em roedores. Os registros das ondas do ECG foram feitos através de eletrodos conectados por meio de agulhas hipodérmicas às patas do rato. Os registros foram obtidos com sensibilidade 1N e velocidade de 50mm/segundo através das derivações (D1, D2, D3, aVR, aVL e aVF). Foi analisada a frequência cardíaca, com a finalidade de estabelecer o intervalo QTc, nos ratos sob efeito da anestesia e com respiração espontânea. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoelétrica definido como segmento TP. O intervalo QTc foi obtido corrigindo-se o intervalo QT pela frequência cardíaca utilizando-se a fórmula de Bazet ($QTc = QT/\sqrt{RR}$) (Sgoifo et al., 1996). As ondas eletrocardiográficas também nos permitiram medir a amplitude (10 mm/mV) e a duração do complexo QRS, bem como o intervalo da onda PR.

4.6. Sacrifício dos animais e coleta das amostras

Quarenta e oito horas após a aplicação da última injeção de nandrolona ou veículo propilenoglicol, período correspondente a quarenta e quatro horas após a última sessão de treinamento físico, os animais foram mortos por decapitação. O coração foi coletado com material autoclavado (tesouras, pinças, placas de petri) e pesado em balança analítica desinfetada com RNase AWAY[®], Invitrogen[™], Molecular BioProducts, Inc., San Diego, CA, para descontaminar de RNases as superfícies de contato com o tecido. A massa do coração foi corrigida pelo peso corporal. Para a correção foi utilizada a fórmula: Peso total do coração/Peso corporal (Lee et al., 2007; Voltera et al., 2008). Porção medial do ventrículo esquerdo (50 – 100 mg de tecido) foi coletada e colocada em eppendorfs contendo 1 mL de solução inibidora de RNases (RNA holder, BioAgency Biotecnologia,

São Paulo, SP). Os tecidos imersos na solução foram estocados em temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise da expressão dos marcadores de hipertrofia cardíaca. RNA holder é um reagente aquoso indicado para preservar e estabilizar o RNA celular de amostras frescas de tecidos em solução, deixando o RNA intacto, sem alteração da qualidade e da quantidade do RNA das amostras, mesmo quando não congelado, eliminando a necessidade de manuseio imediato das amostras ou do seu congelamento em nitrogênio líquido.

O átrio direito foi coletado de todos os animais, de ambos os grupos, e armazenados em freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise da densidade de adrenoceptores beta no tecido atrial, a ser realizada na próxima fase do desenvolvimento deste projeto.

4.7. Expressão dos Marcadores de Hipertrofia Cardíaca.

4.7.1. Expressão gênica do peptídeo natriurético atrial (ANP), alfa-actina esquelética, alfa e beta miosina de cadeia pesada.

Foram detectados pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-Time-PCR). A extração de RNA seguiu-se da seguinte forma: Cada 50 a 100 mg de tecido cardíaco foi homogeneizado em 1mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), sem que o volume das amostras excedessem a décima parte do volume usado do TRIzol[®] Reagent. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Foram adicionados 0.2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol[®] Reagent. Os tubos foram fechados, agitados manualmente por 15 segundos e incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a $12,000\text{ x g}$ por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa contendo precipitado de RNA foi pipetada e misturada com álcool isopropil: 0.5 mL de álcool isopropil por 1 mL de TRIzol[®] Reagent. A amostra foi então encubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e novamente centrifugada a $12,000\text{ x g}$ por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O “pellet” de RNA, agora visível e precipitado no fundo do tubo, foi separado do sobrenadante e lavado com 1 mL de etanol 75% solubilizado em água tratada com DEPC (diethylpyrocarbonate), para eliminar resíduos de fenol e sal. Por fim, a amostra foi novamente misturada e centrifugada a $7,500\text{ x g}$ durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A

quantificação das amostras de RNA total foi determinada por meio de um espectrômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) na razão de absorbância 260/280 nm de comprimento de onda.

A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos. A quantidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S, onde a relação 28S/18S foi de aproximadamente dois. Amostras que apresentassem algum grau de degradação seriam descartadas.

4.7.2. Síntese de cDNA

Foram utilizados 2 µg de RNA total, extraídos a partir do tecido cardíaco dos ratos. As amostras foram incubadas com 0.5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65 °C por 5 min, para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42 °C, a temperatura foi elevada a 95 °C por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados.

4.7.3. Reação de polimerase em cadeia em tempo-real.

O Real-Time PCR foi feito pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento Corbett Rotor-Gene 6000 na presença do composto fluorescente SYBR-Green. A otimização da reação do real-time PCR foi feita conforme as instruções do fabricante, corrigido para volume final de 20 µL por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-Green I master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems).

Depois da otimização, os primers foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e quantificação relativa da expressão dos genes da ciclofilina (gene controle-interno). A expressão dos genes do ANP, alfa-actina esquelética, beta-actina esquelética e miosina de cadeia pesada foi realizada em tecido cardíaco dos ratos de todos os grupos. O gene da ciclofilina é considerado de ampla expansão, e foi utilizado como gene normalizador para os demais genes, pois não sofre alteração com as condições experimentais.

Os primers que foram utilizados estão descritos abaixo:

α -actina esquelética:

sense: 5'-ACC ACA ggC ATT gTT CTg gA-3'

antisense: 5'-TAA ggT AgT CAg TgA ggT CC-3'

β -miosina de cadeia pesada (β -MHC):

sense: 5'-CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3'

antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-3'

α -miosina de cadeia pesada (α -MHC):

sense: 5'-CgA gTC CCA ggT CAA CAA g-3'

antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC C-3'

Peptídeo natriurético atrial (ANP):

sense: 5'-CTT Cgg ggg TAg gAT TgA C-3'

antisense: 5'-CTT ggg ATC TTT TgC gAT CT-3'

Ciclofilina:

sense: 5'-AAT gCT ggA CCA AAC ACA AA-3'

antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA-3'

4.8. Western blot para avaliação da densidade de adrenoceptores do tecido atrial.

O átrio direito foi homogeneizado em tampão de lise contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à 4°C com 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foram analisadas por meio do método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis protéicos foi realizada pela técnica de western blotting. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6 - 12%: dependendo do peso molecular da proteína), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas protéicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish* peroxidase (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário.

Foram utilizados como anticorpos primários o beta-2-Adrenergic-Receptor-antibody (Rabbit polyclonal, 1:1000, Abcan[®], UK), beta-1-Adrenergic-Receptor-antibody (Rabbit polyclonal, 1:500, Abcan[®]), GAPDH-antibody (mouse monoclonal, 1:1000,

Abcan[®]). Em seguida as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários (anti-rabbit, 1:10000, anti-rabbit, 1:10000, anti-mouse, 1:3000; Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como proteína de referência e os resultados relativos obtidos nos quatro grupos experimentais foram normalizados por ela.

4.9. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram determinadas por Análise de Variância Bifatorial (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para comparação múltipla de médias nas análises eletrocardiográficas, para expressão de marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, e para a densidade de adrenoceptores do tecido atrial. Os dados referentes às análises de pressão arterial foram analisados considerando-se três fatores: treinamento, nandrolona e tempo, utilizando-se Análise de Variância com Medidas Repetidas e com estrutura de variância auto-regressiva. O teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas de médias, quando houve valor significativo da estatística F, na Análise de Variância. Valores de *p* menores que 0,05 foram indicativos de significância estatística. Os resultados foram apresentados como médias \pm erros-padrões das médias.

5. RESULTADOS

Não houve diferença estatística significativa no peso inicial, em gramas, dos animais dos quatro grupos experimentais: Não Treinado + Veículo (NTV) (260.5 ± 18.1 g); Treinado + Veículo (TV) (268.5 ± 14.0 g); Não Treinado + Nandrolona (NTN) (256.5 ± 15.6 g); Treinado + Nandrolona (TN) (266.4 ± 12.9 g) ($p > 0.05$). Todavia, no fim do período experimental, o peso corporal dos animais dos grupos TV e TN foi significativamente menor que nos respectivos grupos NTV e NTN (Figura 1A; $p < 0,05$) e também houve diminuição do peso corporal nos grupos NTN e TN em relação aos respectivos grupos NTV e TV (Figura 1A; $p < 0,05$).

A figura 1B apresenta os dados referentes ao peso do coração, apresentado como razão peso do coração/peso corporal dos animais, índice que determina a ocorrência de hipertrofia cardíaca. A razão peso do coração/peso corporal dos grupos TV e TN foi significativamente maior que a dos respectivos grupos NTV e NTN (Figura 1B; $p < 0,05$). Nos grupos NTN e TN também houve aumento nesta razão em relação aos respectivos grupos NTV e TV (Figura 1B; $p < 0,05$).

A figura 2 mostra o gel de qualidade das amostras de RNA total extraídas do ventrículo esquerdo e atesta a integridade delas, as quais foram utilizadas para análise da expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca nos quatro grupo experimentais.

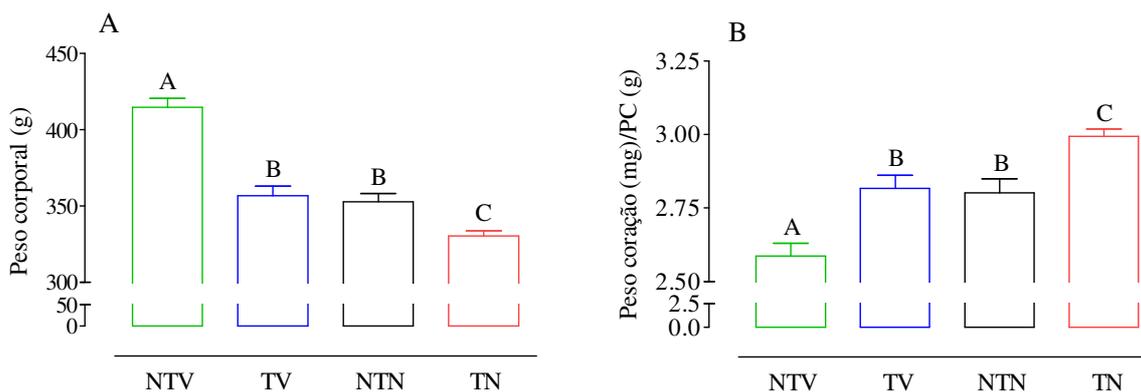


Figura 1. Peso corporal (PC) (em gramas) no fim do período experimental (A) e razão peso do coração (mg)/PC (g) (B), em ratos treinados ou não treinados tratados com veículo propilenoglicol ou Decanoato de Nandrolona. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (ANOVA bifatorial + Teste de Tukey; significância estatística para valores de $p < 0,05$).

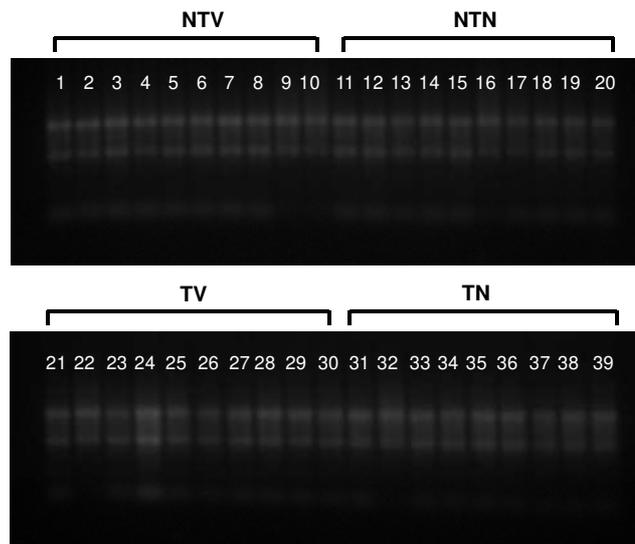


Figura 2. Integridade das amostras de RNA total, extraídas do ventrículo esquerdo, verificada através de eletroforese em gel de agarose. Bandas 1-10: ratos não treinados + veículo (NTV); 11-20: ratos não treinados + nandrolona (NTN); 21-30: ratos treinados + veículo (TV); 31-39: ratos treinados + nandrolona (TN).

Tanto no grupo NTN quanto no TN, a nandrolona diminuiu significativamente a expressão gênica de alfa miosina de cadeia pesada (α -MCP) no ventrículo esquerdo em relação aos respectivos grupos NTV e TV (Figura 3A; $p < 0,05$), porém o treinamento físico não alterou a expressão desse gene (Figura 3A; $p > 0,05$).

A figura 3B mostra que o treinamento físico resistido promoveu diminuição significativa da expressão de beta miosina de cadeia pesada (β -MCP) no ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos treinados (TV e TN) em relação aos respectivos grupos não treinados (NTV e NTN) ($p < 0,05$).

Embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa entre o grupo NTN em relação ao grupo NTV, houve um aumento de 32% na expressão gênica de β -MCP no grupo NTN em relação ao grupo NTV, indicando uma tendência de aumento na expressão deste gene devido ao tratamento com nandrolona (Figura 3B; $p = 0.056$). Também, embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa entre os grupos TV e TN, quando comparamos as porcentagens de diminuição de β -MCP nestes grupos em relação ao grupo NTV, verificamos que no grupo TV houve maior diminuição na expressão de β -MCP (60% de diminuição em relação ao NTV) que no grupo TN (23% de diminuição em relação ao NTV), indicando uma tendência de a nandrolona prejudicar o efeito do

treinamento físico em diminuir a expressão gênica de β -MCP no ventrículo esquerdo (Figura 3B; $p = 0.056$).

A expressão gênica de α -actina esquelética no ventrículo esquerdo foi estatisticamente significativa apenas no grupo em que o treinamento físico foi associado à nandrolona (grupo TN) em relação demais grupos (Figura 3C; $p < 0.05$).

Quanto à expressão gênica de peptídeo natriurético atrial (ANP), apenas o grupo TN apresentou aumento significativo na expressão deste gene em relação aos demais grupos (Figura 3D; $p < 0.05$).

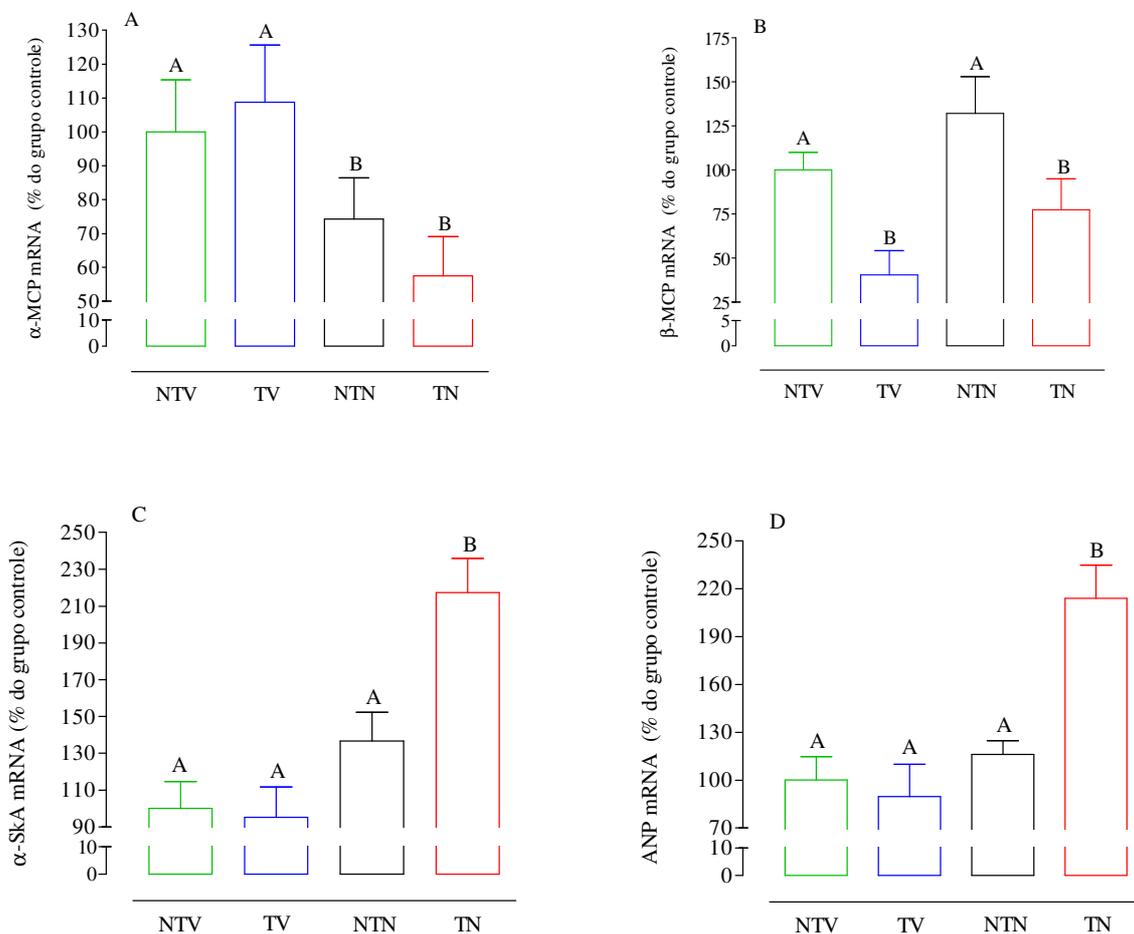


Figura 3. Expressão gênica de marcadores de hipertrofia cardíaca em ratos treinados e não treinados tratados com veículo propilenoglicol ou com esteróide anabólico androgênico Decanoato de Nandrolona. Grupos: Não Treinado + Veículo (NTV); Treinado + Veículo (TV); Não Treinado + Nandrolona (NTN); Treinado + Nandrolona (TN). α -MCP (Alfa miosina de cadeia pesada); β -MCP (Beta miosina de cadeia pesada); α -SkA α -actina esquelética; ANP (Peptídeo natriurético atrial) ($n = 9-10$ animais/grupo). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes (ANOVA bifatorial + Teste de Tukey; significância estatística para valores de $p < 0.05$).

A figura 4 apresenta os valores de pressão arterial sistólica (A), pressão arterial média (PAM) (B), pressão arterial diastólica (C) e frequência cardíaca (D) de ratos dos quatro grupos experimentais. O treinamento físico resistido de alta intensidade diminuiu a pressão arterial sistólica nos grupos TV e TN em relação aos respectivos grupos não treinados nas semanas 3, 4 e 5 (Figura 4A; $p < 0,05$). O treinamento físico também promoveu diminuição da pressão arterial média (figura 4B) e diastólica (figura 4C) nos grupos TV e TN em comparação aos grupos NTV e NTN, respectivamente, durante todas as semanas do período experimental ($p < 0,05$). Nos grupos NTN e TN, a nandrolona promoveu aumento da pressão arterial sistólica na semana 5 em comparação com as semanas 1 e 2 (Figura 4A; $p < 0,05$) (semanas 1 e 2 não diferiram entre si na análise da pressão arterial sistólica).

Na primeira semana do período experimental, o treinamento físico promoveu elevação da frequência cardíaca nos grupos treinados (TV e TN) em relação aos respectivos grupos não treinados (NTV e NTN). Nas semanas 5 e 6, este efeito se inverteu, de modo que a frequência cardíaca diminuiu nos grupos treinados (TV e TN) em relação aos respectivos grupos não treinados (NTV e NTN) (Figura 4D; $p < 0,05$).

Os grupos TV e TN apresentaram menor frequência cardíaca nas semanas 5 e 6 em comparação com as semanas 1 e 2, sendo que as semanas 1 e 2 também diferiram estatisticamente entre si (Figura 4D; $p < 0,05$).

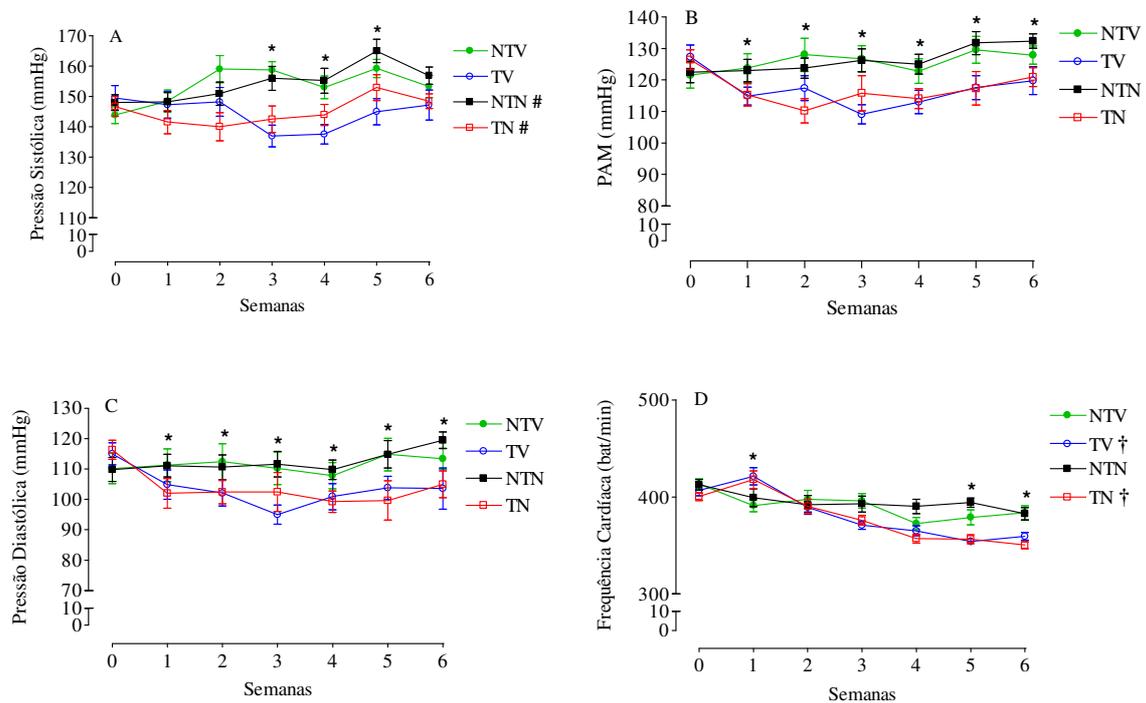


Figura 4. Pressão arterial sistólica (A); pressão arterial média (PAM) (B); pressão arterial diastólica (C); frequência cardíaca (D). Grupos: Não Treinado + Veículo (NTV); Treinado + Veículo (TV); Não Treinado + Nandrolona (NTN); Treinado + Nandrolona (TN). * Grupos treinados são estatisticamente diferentes dos grupos não treinados ($p < 0,05$). # Diferença estatisticamente significativa da semana 5 em comparação com as semanas 1 e 2 ($p < 0,05$) (semanas 1 e 2 não diferem entre si). † Diferença estatisticamente significativa das semanas 5 e 6 em comparação com as semanas 1 e 2 (semanas 1 e 2 também diferem estatisticamente entre si) ($p < 0,05$). Foi utilizada análise de variância com medidas repetidas e com estrutura de variância auto-regressiva. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. $N = 12$ animais/grupo.

A tabela 2 mostra os valores do intervalo PR (A), do intervalo QRS (B), da amplitude do complexo QRS (C), do intervalo QT (D) e do intervalo QTc (E), obtidos no eletrocardiograma dos 4 grupos experimentais. O treinamento físico e o tratamento com nandrolona não alteraram a duração dos intervalos PR, QRS e QT ($p > 0,05$) e a amplitude do complexo QRS ($p > 0,05$). O tratamento com nandrolona promoveu um prolongamento do intervalo QTc nos grupos NTN e TN em comparação com os grupos NTV e TV, respectivamente ($p < 0,05$).

Table 2: Parâmetros eletrocardiográficos e frequência cardíaca de ratos submetidos a treinamento físico resistido de alta intensidade e tratados com nandrolona ou veículo.

Parâmetros	NTV	TV	NTN	TN
Intervalo PR (ms)	44,17±1,26	43,00±0,47	42,64±0,88	44,50±1,03
Intervalo QRS (ms)	30,50±0,51	31,44±0,30	32,79±0,81	31,40±0,52
Amplitude QRS (mV)	0,33±0,02	0,39±0,03	0,37±0,01	0,37±0,02
FC (bat/min)	191,2±3,6	196,2±1,5	200,6±2,8	193,8±4,7
Intervalo QT (ms)	56,50±0,51	56,56±0,41	57,79±0,81	57,20±0,33
Intervalo QTc (ms)	101,00±1,04 ^a	102,00±1,17 ^a	104,80±0,76 ^b	104,70±0,53 ^b

NTV = Não treinado + veículo; TV = Treinado + veículo; NTN = Não treinado + nandrolona; TN = Treinado + nandrolona. Intervalo PR = Intervalo correspondente ao tempo percorrido pelo estímulo elétrico desde o início da onda P até o início do complexo QRS; Intervalo QRS = corresponde ao tempo percorrido pelo estímulo durante a ativação ventricular; Amplitude QRS = Variação de potencial elétrico do complexo QRS; FC = Frequência cardíaca; Intervalo QT = corresponde ao tempo percorrido pelo estímulo desde o início do complexo QRS ao final da onda T; QTc = Intervalo QT corrigido pela raiz quadrada do intervalo entre duas ondas R sucessivas (R-R). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si (ANOVA + teste de Tukey; $p < 0,05$). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. N = 10-12 animais/grupo.

A figura 5 mostra a análise representativa das proteínas obtidas por *western blot* no átrio direito de ratos dos quatro grupos experimentais (A), bem como a população de adrenoceptores β_1 (B) e de adrenoceptores β_2 (C). O tratamento com nandrolona promoveu aumento significativo na população de adrenoceptores β_1 nos grupos NTN e TN em comparação aos respectivos grupos NTV e TV (Figura 5B; $p < 0,05$). Houve também aumento significativo da expressão de adrenoceptores β_2 nos grupos NTN e TN em comparação aos respectivos grupos NTV e TV (Figura 5C; $p < 0,05$). Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão de adrenoceptores β_1 ou adrenoceptores β_2 no grupo TV em relação ao NTV ($p > 0,05$), mas o treinamento físico promoveu uma diminuição de 22% na expressão de adrenoceptores β_1 e 14% na expressão de

adrenoceptores β_2 no átrio direito do grupo TV em comparação ao NTV (Figura 5C). O NTV foi considerado como grupo controle.

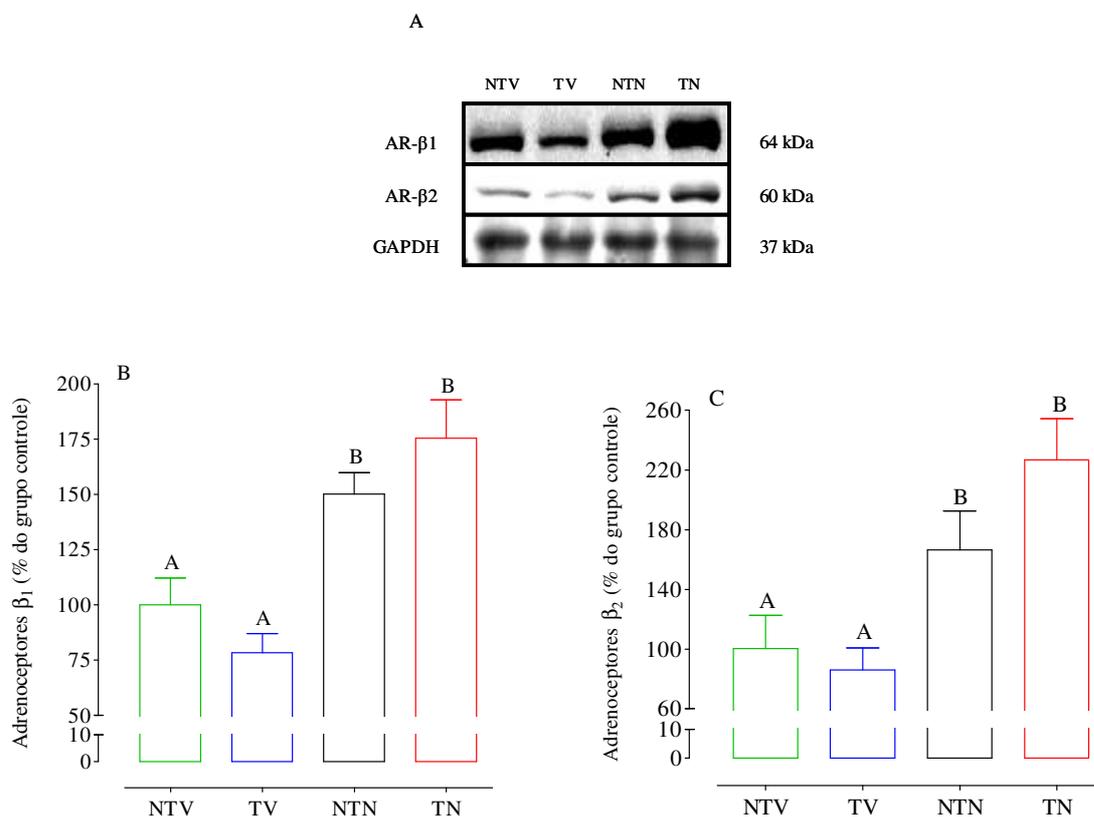


Figura 5. Figura representativa da análise de western blot para os adrenoceptores β_1 (AR- β_1), adrenoceptores β_2 (AR- β_2), e a proteína de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) dos quatro grupos experimentais (A); níveis de proteínas AR- β_1 (B); níveis de proteínas AR- β_2 (C). Grupos: Não Treinado + Veículo (NTV); Treinado + Veículo (TV); Não Treinado + Nandrolona (NTN); Treinado + Nandrolona (TN). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Foi utilizada análise de variância bifatorial + teste de Tukey. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Foram utilizados 6 animais por grupo.

6. DISCUSSÃO

A hipertrofia cardíaca ocorre em resposta a sobrecargas hemodinâmicas crônicas e é considerada um processo adaptativo do miocárdio a tais sobrecargas, todavia é também um fator de risco para morbi-mortalidade cardiovascular (Franchini, 2001). Ela decorre do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da microcirculação coronariana (Garcia & Incerpi, 2008), mas durante o seu estabelecimento podem também ser re-expressos genes característicos da vida fetal, tais como algumas isoformas de proteínas contráteis e o peptídeo natriurético atrial, conferindo imaturidade à célula hipertrofiada. As razões e possíveis vantagens da re-expressão de genes fetais não são ainda adequadamente conhecidas, todavia, a detecção deles em quantidades significativas na hipertrofia miocárdica permite seu uso como marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (Franchini, 2001). Ainda não está bem elucidado qual é o fator primário que estimula a hipertrofia cardíaca, se são fatores mecânicos (tensão e deformação) ou neuro-humorais, ou mesmo a interação deles (Garcia & Incerpi, 2008). Estes fatores promovem alterações bioquímicas intracelulares capazes de regular a transcrição e determinar a expressão de genes que induzem a hipertrofia cardíaca (Garcia & Incerpi, 2008). Em estudos experimentais, o índice mais comumente utilizado para determinar a hipertrofia cardíaca é a razão peso do coração/peso corporal (Conrad et al., 1991; Hart, 2003); seguindo esta condição, este índice foi também utilizado no presente trabalho para determinar a hipertrofia cardíaca, de acordo com Rocha et al., (2007).

Os resultados do presente trabalho mostram que a nandrolona, por si só, ou combinada com treinamento físico resistido de alta intensidade, induziu hipertrofia cardíaca evidenciada pelo aumento da razão peso do coração/peso corporal. Por sua vez, esta hipertrofia induzida pela nandrolona foi associada com a re-expressão de genes característicos da vida fetal. Por outro lado, o treinamento físico, isoladamente, também induziu hipertrofia cardíaca no grupo tratado apenas com veículo propilenoglicol, todavia, sem induzir a re-expressão de genes fetais.

Tanto treinamentos físicos resistidos quanto a associação destes com o uso de doses supra-fisiológicas de esteróides anabólicos androgênicos parecem exercer importante

papel no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. O treinamento físico resistido é capaz de promover hipertrofia cardíaca concêntrica em humanos (D'Andrea et al., 2006) e em ratos (Barauna et al., 2007). Rocha et al., (2007) , demonstraram que o uso de doses supra-fisiológicas de nandrolona exacerbam a hipertrofia cardíaca em ratos submetidos a treinamento físico aeróbio. Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, foram observadas hipertrofias cardíacas em ratos de laboratório submetidos ao mesmo protocolo de treinamento físico resistido utilizado no presente estudo, com aumento da razão peso do coração/peso corporal, em ratos treinados e tratados com veículo propilenoglicol ou nandrolona, em relação aos respectivos grupos controles. A avaliação por ecodopplercardiograma também demonstrou hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico resistido em ratos tratados tanto com veículo propilenoglicol quanto com nandrolona, bem como demonstrou aumento da espessura do septo interventricular e diminuição do débito cardíaco em ratos tratados com nandrolona, não treinados e treinados, em relação aos respectivos grupos tratados com veículo propilenoglicol (Tanno et al., 2006a; Tanno et al., 2006b). Portanto, a hipertrofia cardíaca observada no presente trabalho, tanto em decorrência da aplicação de doses supra-fisiológicas de nandrolona quanto do treinamento físico ou da associação de ambos, confirma os resultados observados anteriormente por Tanno (2007) em nosso laboratório.

Do ponto de vista molecular, a hipertrofia cardíaca pode determinar alterações na expressão gênica de proteínas contráteis, de modo que a distribuição das isoformas de miosina de cadeia pesada (α -MCP e β -MCP) podem ser modificadas em resposta a uma sobrecarga de trabalho, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Moore, 1998; Oliveira et al., 2006). Além disso, na hipertrofia cardíaca pode ocorrer re-expressão significativa de α -actina esquelética no tecido cardíaco e re-expressão de genes de proteínas não-contráteis, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) (Silva & Krieger, 2000), o qual dificilmente aumenta sua expressão nos miócitos ventriculares de ratos adultos normais, todavia aumenta significativamente sua expressão na hipertrofia cardíaca patológica (Izumo et al., 1988; Kim & Iwao, 2000). A re-expressão do gene do ANP e outros marcadores genéticos embrionários pode ser considerado um entre vários outros fatores capazes de

distinguir estímulos que aceleram o crescimento normal (tróficos), dos estímulos que são hipertróficos, indicando o começo de uma resposta patológica (Silva & Krieger, 2000).

No presente estudo observamos hipertrofia cardíaca nos ratos submetidos ao treinamento físico resistido, tratados tanto com veículo propilenoglicol (grupo TV) quanto com decanoato de nandrolona (grupo TN). Tanto no grupo TV quanto no grupo TN, o exercício físico foi capaz de diminuir a expressão gênica da isoforma β -MCP, predominante no ventrículo do rato durante as etapas do desenvolvimento do coração no período fetal ou perinatal (Silva & Krieger, 2000) sem promover alteração na expressão gênica da isoforma α -MCP, dominante no ventrículo do rato durante toda a vida adulta (Oliveira et al., 2006). Este achado demonstra que o protocolo de treinamento físico resistido utilizado no presente estudo é eficiente em provocar “downregulation” da expressão do gene da β -MCP ventricular, mas não se mostrou eficiente em promover “upregulation” da expressão do gene da α -MCP ventricular. Este resultado se assemelha ao demonstrado por Scheinowitz & colaboradores (2003), os quais encontraram uma diminuição na expressão de β -MCP ventricular no coração de ratos treinados com natação por duas semanas, mas esta redução não foi significativa após 6 semanas de treinamento. Portanto, os resultados observados no presente trabalho parecem contradizer o que ocorre na hipertrofia cardíaca patológica, que é um aumento na expressão do gene da β -MCP. E Barauna & colaboradores (2008) não encontraram quaisquer alterações na expressão dos genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica em ratos submetidos a treinamento físico de resistência. No presente trabalho, embora o treinamento físico resistido não tenha promovido aumento significativo na expressão de α -MCP ventricular, a diminuição promovida na expressão de β -MCP sugere que ele possa ser capaz de aumentar a proporção de α -MCP em relação a β -MCP no miocárdio e que a hipertrofia observada no grupo TV seja fisiológica. Aumento na proporção de α -MCP em relação a β -MCP indica alta atividade ATPase miosínica, que está associada com melhora da função sistólica (Scheinowitz et al., 2003). Todavia, a associação deste treinamento com nandrolona sugere que possíveis efeitos benéficos do treinamento físico resistido sobre a função sistólica ventricular poderiam ser prejudicados, pois a nandrolona foi capaz de diminuir a expressão de α -MCP ventricular nos grupos NTN e TN em relação aos respectivos grupos NTV e TV,

um efeito negativo que também sugere uma possibilidade de a nandrolona ser capaz de aumentar a proporção de β -MCP ventricular em relação a α -MCP. A isoforma β -MCP ventricular apresenta baixa atividade ATPase miosínica, portanto, aumentos na proporção miocárdica de β -MCP está associado com diminuição da velocidade de encurtamento do cardiomiócito (Kim & Iwao, 2000), podendo culminar em redução de sua complacência. Estes resultados de expressão gênica das isoformas de miosina de cadeia pesada podem ajudar a explicar resultados anteriores realizados em nosso laboratório por Tanno (2007), que demonstrou que o mesmo protocolo de treinamento físico resistido utilizado no presente estudo promoveu hipertrofia cardíaca e foi capaz de aumentar a velocidade de encurtamento circunferencial do ventrículo esquerdo; portanto, embora o treinamento não tenha promovido aumento do débito cardíaco, os resultados sugeriram que o miocárdio desenvolveu mecanismos para melhorar essa função. Em contrapartida, no trabalho de Tanno (2007), os animais que foram tratados com nandrolona, não treinados e treinados, apresentaram prejuízos cardíacos de funções sistólicas e diastólicas. Na análise realizada por Tanno (2007), via ecodoplercardiograma, observou-se que o tratamento com nandrolona, isoladamente ou em associação com o treinamento físico resistido de alta intensidade, provocou diminuição no índice cardíaco de ratos, indicando prejuízo sistólico, sem qualquer alteração no grupo de ratos treinados e tratados com veículo propilenoglicol. Do mesmo modo, o ecodoplercardiograma mostrou que a nandrolona, por si só ou em associação com o treinamento físico resistido, prejudicou a função diastólica por reduzir a velocidade de fluxo transmitral inicial e por aumentar o tempo de relaxamento ventricular isovolumétrico do ciclo cardíaco.

Além dos resultados supramencionados, a associação de treinamento físico resistido com decanoato de nandrolona promoveu “upregulation” da expressão do gene da α -actina esquelética no grupo TN em relação aos demais grupos. Além disso, a nandrolona promoveu 37% de aumento na expressão deste gene no grupo NTN em relação ao grupo NTV. Estes achados demonstram que a nandrolona, associada ou não ao treinamento físico resistido, além de prejudicar a expressão ventricular normal de genes para proteínas contráteis, pode também promover a re-expressão de genes característicos da vida fetal no miocárdio hipertrofiado, sendo ela, por vezes, um importante fator capaz de contribuir para

a gênese de hipertrofia cardíaca patológica. Na ausência de nandrolona, o exercício físico resistido de alta intensidade não foi capaz de promover re-expressão da α -actina esquelética no miocárdio hipertrofiado.

Em fases mais precoces da hipertrofia cardíaca as isoformas fetais das proteínas supramencionadas podem ser re-expressas significativamente, todavia, em fases mais avançadas, em geral quando o miocárdio hipertrofiado começa a desempenhar os primeiros sinais de queda no desempenho mecânico, começam a ocorrer alterações significativas na re-expressão de genes mais diretamente envolvidos na homeostase iônica dos miócitos e é nesta fase que ocorre a re-expressão do peptídeo natriurético atrial (ANP) (Mill & Vassalo, 2001). No presente estudo, houve re-expressão significativa do gene do ANP no grupo TN em relação a todos os outros grupos, demonstrando que a associação de nandrolona com exercício físico resistido é eficiente em promover hipertrofia cardíaca patológica, haja vista que a re-expressão significativa do gene do ANP, associada à re-expressão de outros marcadores genéticos embrionários, como por exemplo a α -actina esquelética, pode ser considerada um entre vários critérios que indicam hipertrofia cardíaca patológica (Silva & Krieger, 2000).

Os resultados obtidos nas análises dos genes da α -MCP, β -MCP, α -actina esquelética e ANP, confirmam que a nandrolona, isoladamente ou em associação com o treinamento físico, é capaz de promover hipertrofia cardíaca patológica no coração de ratos. Além disso, estes resultados moleculares contribuem para corroborar aqueles resultados funcionais obtidos por Tanno (2007) via ecodoplercardiograma.

A hipertrofia cardíaca ocorre em resposta ao treinamento físico, mas também pode resultar de doenças cardiovasculares como a hipertensão (Fenning et al., 2003). Quando promovida pela prática de exercícios físicos é considerada fisiológica e benéfica ao coração, pois melhora o metabolismo celular, a estrutura do ventrículo esquerdo, o fluxo sanguíneo das artérias e conseqüentemente a função cardíaca, todavia é considerada patológica quando associada a doenças cardiovasculares crônicas, pois está relacionada a perda da função cardíaca (Fenning et al., 2003; Tanno, 2007). Além da hipertrofia cardíaca, outras adaptações cardiovasculares induzidas pelo treinamento físico resistido ainda não são tão bem documentadas, nos relatos médicos, quanto são bem documentados os

benefícios cardiovasculares resultantes do treinamento físicos aeróbio, como por exemplo, a redução da pressão arterial (Barauna et al., 2005). Alguns estudos em humanos sugerem que o treinamento físico resistido possa reduzir a pressão arterial (Kelley & Kelly, 2000; Ray & Carrasco, 2000; Carter et al., 2003), todavia, apenas recentemente ele tem sido, similarmente ao exercício físico aeróbio, indicado como uma das intervenções para prevenir ou controlar a hipertensão arterial (American Coolege of Sports Medicine, 1993; Barauna et al., 2005).

Durante a realização do exercício físico, o organismo é retirado de sua homeostase em função da demanda energética muscular e do organismo como um todo (Brum et al., 2004). Durante esse processo, a quantidade de sangue bombeado pelo coração é alterada para suprir a demanda da musculatura esquelética por oxigênio. Para que essa demanda seja atendida, durante o exercício físico ocorrem alterações nos sistemas nervoso simpático e parassimpático com a finalidade de aumentar a frequência cardíaca, efeito este que ocorre por intermédio do nodo sino-atrial devido a interação das catecolaminas endógenas com receptores adrenérgicos presentes no marcapasso cardíaco. Já durante o repouso observa-se bradicardia por redução do tônus simpático no coração, principalmente em consequência de exercícios físicos de baixa a moderada intensidade, o que promove também diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial (Negrão & Rondon, 2001). Todavia, as adaptações desencadeadas pelo treinamento físico resistido de alta intensidade sobre a pressão arterial ainda precisam ser bem esclarecidas (Barauna et al., 2005). Somando-se a isso, o que muitas vezes tem ocorrido em academias, e até mesmo entre atletas de alto nível, é a associação do uso de altas doses de esteróides anabólicos androgênicos com o treinamento de força ou o exercício físico anaeróbio (Grogan et al., 2006). Porém, a literatura tem demonstrado que os efeitos desta associação podem ser muito prejudiciais para a estrutura e função cardíaca (Tanno et al., 2011) e podem estar associados à morte súbita de jovens atletas (Fineschi et al., 2001; Urhansen et al., 2004; Nottin et al., 2006).

O presente trabalho demonstra efeitos benéficos do treinamento físico, utilizado no presente estudo, sobre a pressão arterial sistólica, média, diastólica e frequência cardíaca de ratos dos grupos TV e TN, similares aos observados em exercícios físicos de leve e

moderada intensidades. O treinamento físico resistido de alta intensidade reduziu a pressão arterial sistólica nas semanas 3, 4 e 5 e as pressões média e diastólica em todas as semanas do protocolo experimental em comparação aos ratos dos grupos não treinados. Do ponto de vista hemodinâmico, essa diminuição na pressão arterial poderia ser explicada por queda na resistência vascular periférica total ou redução no débito cardíaco (Negrão & Rondon, 2001). De fato, o estudo de Cunha et al. (2005a) demonstrou que o mesmo protocolo de treinamento físico resistido de alta intensidade utilizado no presente estudo foi capaz de induzir subsensibilidade à fenilefrina na aorta torácica de ratos treinados, sugerindo que este protocolo promove uma adaptação vascular benéfica que pode estar relacionada a um aumento na produção de óxido nítrico (NO) endotelial. Nesse sentido, os efeitos deste protocolo de treinamento físico sobre a redução da pressão arterial sistólica, média e diastólica, em comparação aos ratos não treinados, poderiam estar relacionados a uma maior produção de NO como resposta adaptativa endotelial aos altos fluxos sanguíneos induzidos pelo treinamento, independentemente do tratamento com nandrolona no grupo TN. Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou que o mesmo protocolo de treinamento físico resistido utilizado neste estudo promoveu diminuição significativa da produção de espécies reativas de oxigênio na aorta torácica de ratos em comparação a animais não treinados (Guzzoni, 2010), o que implica, fisiologicamente, em menores possibilidades de degradação de NO produzido pelo endotélio vascular. Este mesmo mecanismo poderia ser aplicado às adaptações vasculares periféricas, pois o treinamento físico resistido pode levar a um aumento da exposição dos vasos ao estresse de cisalhamento sanguíneo e estimular a produção de substâncias vasoativas que podem contribuir para mudanças funcionais e estruturais nos vasos de resistência (Delp e Laughlin, 1997; Barauna et al., 2005). Embora neste estudo não tenhamos investigado a produção de substâncias vasoativas capazes de promover relaxamento vascular, esta hipótese é condizente com os resultados de redução da pressão arterial obtidos nos grupos TV e TN em comparação aos grupos NTV e NTN, respectivamente. Uma queda no débito cardíaco dos ratos treinados também pode ter ocorrido, uma vez que o treinamento influenciou a queda da frequência cardíaca dos grupos TV e TN em relação aos respectivos NTV e NTN.

Os resultados do presente trabalho mostram que a nandrolona foi capaz de promover aumento de pressão arterial sistólica ao longo do tempo dentro de um mesmo grupo experimental, ou seja, no grupo NTN a nandrolona promoveu elevada pressão arterial sistólica na quinta semana em relação a primeira e segunda semanas de tratamento. Exatamente o mesmo resultado ocorreu no grupo TN como efeito principal da nandrolona. Estes resultados nos mostram que, independentemente do treinamento físico, o uso crônico de doses supra-fisiológicas de nandrolona pode influenciar significativamente a pressão arterial sistólica quando se leva em conta o tempo de tratamento e não apenas a comparação entre grupos, sugerindo que seu uso crônico pode realmente cancelar os efeitos benéficos do treinamento físico resistido sobre a pressão arterial sistólica dentro de um mesmo grupo experimental.

Ainda não estão claros os efeitos dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) na elevação da pressão arterial em humanos saudáveis devido à existência de muitos resultados conflitantes (Achar et al., 2010), tampouco estão claros os mecanismos que poderiam gerar hipertensão arterial em usuários de altas doses de EAA e em animais experimentais. Todavia, dando suporte aos resultados obtidos no presente estudo e à hipótese da influência da produção de óxido nítrico endotelial no controle da pressão arterial, Cunha et al. (2005a) demonstraram, em estudo *in vitro*, que a nandrolona cancelou a subsensibilidade à fenilefrina induzida pelo treinamento físico resistido de alta intensidade na aorta torácica de ratos treinados e tratados com nandrolona. Já foi também demonstrado na literatura que doses elevadas de nandrolona aumentam a reatividade vascular à epinefrina e reduzem o relaxamento vascular induzido por nitroprussiato de sódio em anéis aórticos de coelhos (Ammar et al., 2004). No trabalho de Guzzoni (2010), desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o tratamento com nandrolona reduziu significativamente a produção de óxido nítrico endotelial na aorta torácica de ratos, submetidos ou não ao treinamento físico resistido de alta intensidade. Além disso, os resultados apresentados no presente trabalho corroboram estudos em humanos que observaram hipertensão arterial em atletas saudáveis que realizavam treinamento de força e resistência em associação com o uso de esteróides anabólicos

androgênicos (Hartgens & Kuipers, 2004). Ainda, aumento da rigidez aórtica também já foi demonstrada em atletas usuários de EAA (Kasikcioglu et al., 2007).

A frequência cardíaca, entretanto, não foi alterada pelo tratamento com nandrolona, apenas pelo treinamento físico. Somente na primeira semana o treinamento físico promoveu elevação da frequência cardíaca nos grupos TV e TN em comparação com os respectivos grupos NTV e NTN, o que pode ter acontecido em função de níveis elevados de catecolaminas circulantes nos instantes iniciais do treinamento físico, gerando efeito cronotrópico positivo. Esta elevação da frequência cardíaca na primeira semana de treinamento não se manteve nas semanas seguintes e o treinamento físico então inverteu seu efeito anterior, promovendo significativa bradicardia de repouso nas semanas 5 e 6. Do mesmo modo, o treinamento físico foi capaz de induzir significativa bradicardia de repouso nos grupos TV e TN nas semanas 5 e 6 em comparação com as semanas 1 e 2 (semana 2 também foi estatisticamente diferente da semana 1). Os resultados obtidos no presente trabalho a respeito dos efeitos do treinamento físico resistido de alta intensidade sobre a frequência cardíaca de repouso são coerentes com resultados obtido por Rocha et al. (2007) em ratos submetidos a treinamento físico aeróbico, tratados ou não com decanoato de nandrolona.

A redução da frequência cardíaca de repouso é normalmente observada como um efeito positivo do treinamento e é frequentemente vista como uma adaptação crônica de treinamentos de resistência (Barauna et al., 2005) devido a um aumento do tônus parassimpático e diminuição do simpático. Esta adaptação também ocorreu nos resultados do presente trabalho como efeito principal do treinamento físico resistido de alta intensidade, independentemente do tratamento com nandrolona no grupo TN quando comparado com o NTN.

Além da pressão arterial, os dados apresentados neste trabalho evidenciaram a ocorrência de efeitos deletérios causados pela nandrolona sobre a eletrofisiologia cardíaca. A análise eletrocardiográfica revelou mudanças no padrão elétrico cardíaco representado pelo prolongamento do intervalo QTc induzido pela nandrolona. Este prolongamento do intervalo QTc pode ser causado por dois mecanismos. Primeiro, um aumento da atividade vagal poderia prolongar o intervalo QTc e, segundo, a hipertrofia cardíaca poderia também

prolongar o processo de repolarização ventricular (Stolt et al., 1999). Poderíamos até considerar a possibilidade de uma influência vagal no grupo TN, posto que sinais de aumentada atividade vagal estão presentes nos grupos TN e TV (como se verifica na figura 4D, por exemplo, pela bradicardia de repouso induzida pelo treinamento físico). Todavia, embora ambos os grupos treinados tenham apresentado bradicardia de repouso, o grupo TV não apresentou prolongamento do intervalo QTc, eliminando então, a hipótese de que o prolongamento deste intervalo poderia estar relacionado a maior atividade vagal.

O prolongamento do intervalo QTc apenas nos grupos tratados com nandrolona (NTN e TN), sugere que um retardo no processo de repolarização ventricular causado pela hipertrofia cardíaca patológica observada no presente trabalho e em trabalho anterior publicado por nosso grupo de pesquisa, usando o mesmo protocolo experimental (Tanno et al., 2011), tenha sido a gênese do prolongamento deste intervalo. O prolongamento deste intervalo, mostrado no presente trabalho, está de acordo com Maior et al. (2010), que observaram prolongamento do QTc em usuários de EAA, sugerindo a presença de anormalidades na repolarização ventricular que poderiam potencializar o risco de arritmias cardíacas e morte súbita em atletas (Casavant et al., 2007).

Nossa hipótese inicial foi que um aumento deste intervalo, caracterizando a chamada síndrome do intervalo QT prolongado, por predispor à ocorrência de arritmias e morte súbita, poderia estar relacionado a alterações no cronotropismo cardíaco. Por um lado, esta hipótese parece não ter uma relação tão direta com alterações no cronotropismo cardíaco em decorrência dos resultados obtidos no presente trabalho, pois a nandrolona, por si só, embora tenha promovido prolongamento do intervalo QTc e aumento na população de adrenoceptores β no tecido atrial dos grupos NTN e TN, não promoveu qualquer alteração na frequência cardíaca de repouso dos animais destes mesmos grupos experimentais. Por outro lado, nossa hipótese inicial não pode ser descartada, pois o aumento no cronotropismo que pode levar à morte súbita é o aumento da frequência cardíaca durante o exercício e não em repouso. Logo, o fato de a nandrolona não ter alterado a frequência cardíaca de repouso não exclui a possibilidade de que durante o exercício, no grupo treinado e tratado com nandrolona, a frequência cardíaca possa aumentar além da normalidade. Para avaliar esta hipótese seria necessário fazer registros

durante o treinamento por meio de telemetria. O aumento na expressão dos adrenoceptores β_1 e β_2 nos grupos tratados com nandrolona dá suporte a esta interpretação.

Em estudo anterior conduzido em nosso laboratório, análises de curvas concentração-efeito à adrenalina e noradrenalina obtidas *in vitro* indicaram que o treinamento físico e o tratamento com decanoato de nandrolona, isoladamente, pareciam induzir alteração na homogeneidade da população de adrenoceptores beta no tecido atrial (Tanno, 2007). Logo, para complementar aqueles resultados e identificar o tipo e grau de alteração ocorrida nestes adrenoceptores, nossa proposta foi analisar a densidade de adrenoceptores β_1 e β_2 no átrio direito cardíaco de ratos dos quatro grupos experimentais em questão.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o tratamento com nandrolona aumentou significativamente a densidade de adrenoceptores β_1 e β_2 no tecido atrial dos grupos NTN e TN em relação aos respectivos grupos NTV e TV, sem alteração estatística significativa no grupo TV em relação ao NTV.

Em princípio imaginávamos que o treinamento físico, por ser de alta intensidade, estimularia a liberação de altas doses de catecolaminas, desencadeando hipertrofia cardíaca que, por sua vez, não resultaria em maior eficiência do coração. Como resposta compensatória à não ocorrência de aumento de força, o marcapasso cardíaco desenvolveria supersensibilidade às catecolaminas e aumentaria a frequência cardíaca frente a estímulo simpático. Todavia, não foi isso que observamos ao final do período experimental. O treinamento físico resistido de alta intensidade não promoveu alteração estatística significativa na população de adrenoceptores β_1 (22% de diminuição comparado ao NTV) ou na população de adrenoceptores β_2 (14% de diminuição comparado ao NTV) no tecido atrial, mas parece ter sido capaz de reduzir o tônus simpático nos animais treinados, dada a bradicardia de repouso observada nas últimas semanas do protocolo experimental.

Diante dos mecanismos fisiológicos de dessensibilização e aumento da sensibilidade a agonistas adrenérgicos descritos na literatura (Barros et al., 1999), os resultados do presente trabalho são intrigantes, pois o aumento na população de adrenoceptores β_1 (AR- β_1) e β_2 (AR- β_2) no tecido atrial de ratos tratados com nandrolona

não resultou em aumento na frequência cardíaca basal *in vivo*. Ou seja, as alterações ocorridas no nível molecular nos grupos NTN e TN não refletiram no nível funcional em repouso. Uma hipótese é de que o período de tratamento possa ter sido insuficiente para que isso pudesse ocorrer. Todavia, a não alteração da resposta cronotrópica *in vivo* não exclui a hipótese de que a maior expressão de AR- β_1 e AR- β_2 possam estar relacionadas a uma maior resposta às catecolaminas durante o treinamento no grupo TN. Se isso ocorresse, poderia compensar os efeitos negativos da nandrolona sobre a morfo-fisiologia cardíaca durante a realização da atividade física. Diante disso, este aumento significativo da expressão de AR- β_1 e AR- β_2 no átrio direito de ratos nos sugere que o coração destes animais provavelmente estava criando mecanismos na tentativa de compensar prejuízos funcionais causados por hipertrofia cardíaca patológica induzida por nandrolona (Tanno et al., 2011). Porém a metodologia utilizada no presente estudo não permite esclarecer esta hipótese. Para isso seria necessária a aferição da frequência cardíaca durante a realização do exercício físico, por exemplo pelo método de telemetria.

A não influência do aumento da expressão de adrenoceptores atriais na frequência cardíaca de repouso deve levar em conta que a análise da pressão arterial foi feita *in vivo*, logo, com modulação do sistema nervoso simpático e parassimpático sobre o cronotropismo cardíaco. E também devemos levar em conta que o aumento da expressão de adrenoceptores atriais, observado nos animais tratados com nandrolona, não fez distinção entre receptores presentes na superfície e receptores internalizados no tecido.

Enfim, os motivos pelos quais esse aumento da população de adrenoceptores atriais nos grupos tratados com anabolizantes não influenciou a frequência cardíaca *in vivo* poderiam estar relacionados a vários eventos: seja devido a internalização temporária de adrenoceptores (Bünemann et al., 1999), tornando-os inacessíveis para ativar seus ligantes, ou devido a alterações no acoplamento dos adrenoceptores aos sistemas de segundos mensageiros, ou mesmo devido a alterações nas estruturas destes receptores, o que reduziria suas afinidades pelos seus agonistas (Barros et al., 1999). Todavia, os motivos reais pelos quais a nandrolona não influenciou a frequência cardíaca de repouso, apesar de ter causado aumento na população de adrenoceptores β , vão muito além do presente estudo e requerem futuras investigações para serem entendidos. Inclusive, novas análises da relação

simpático/parassimpático precisariam ser feitas para avaliar o grau de influência destes sistemas sobre o cronotropismo cardíaco de ratos submetidos aos tratamentos realizados no presente estudo. Também, registros da frequência cardíaca precisariam ser feitos em tempo real, durante o treinamento, para avaliarmos o grau de influência do aumento da população dos adrenoceptores beta sobre o cronotropismo cardíaco de ratos tratados com nandrolona.

Em suma, o presente estudo demonstrou que o tratamento com nandrolona causou hipertrofia cardíaca associada à re-expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, causou elevação da pressão arterial sistólica dependente do tempo de tratamento, promoveu prolongamento do intervalo QTc no eletrocardiograma e aumentou a expressão de AR- β_1 e AR- β_2 no átrio direito de ratos, o que parece representar uma resposta compensatória aos efeitos negativos da nandrolona sobre o coração, independente do treinamento físico resistido de alta intensidade.

7. CONCLUSÕES

1. O tratamento com alta dose do esteróide anabólico androgênico decanoato de nandrolona induziu hipertrofia cardíaca associada a alterações na expressão de genes de proteínas contráteis e a re-expressão de genes de proteínas não contráteis, indicando que, do ponto de vista molecular, a nandrolona é capaz de induzir hipertrofia cardíaca patológica.
2. O tratamento com decanoato de nandrolona elevou a pressão arterial sistólica dependente do tempo de tratamento, induziu prolongamento do intervalo QTc nas análises eletrocardiográficas e aumentou a população de adrenoceptores β_1 e β_2 no átrio direito de ratos não treinados e treinados, sugerindo ser, esta, uma resposta compensatória aos efeitos negativos produzidos pela nandrolona sobre o coração, independente do treinamento físico resistido de alta intensidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achar S, Rostamian A, Narayan SM. Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. *Am J Cardiol.* 2010; 106:893-901.

Alquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948; 153(3):586-600.

American Coolege of Sports Medicine. Position Stand. Physical activity, physical fitness, and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:i-x.

Ammar EM, Said SA, Hassan MS. Enhanced vasoconstriction and reduce vasorelaxation induced by testosterone and nandrolone in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res.* 2004; 50:253-9.

Barauna VG, Batista ML Jr, Costa Rosa LF, Casarini DE, Krieger JE, Oliveira EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32:249-54.

Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295:R381-7.

Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, de Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res.* 2007; 5(2):114-20.

Barros RA, Okoshi MP, Cicogna AC. Via Beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. *Arq Bras Cardiol.* 1999; 72:641-8.

Bassani RA, De Moraes S. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of β -adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 246:316-21.

Berns JS, Rudnick MR, Cohen RM. A controlled trial of recombinant human erythropoietin and nandrolone decanoate in the treatment of anemia in patients on chronic hemodialysis. *Clin Nephrol.* 1992; 37(5):264-7.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72:248-54.

Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Ver.* 1999; 51(4):651-89.

Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício

físico no sistema cardiovascular. *Revista Paulista de Educação Física*. 2004; 18:21-31.

Bünemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 1999; 61:169-92.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, *et al.* International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994; 46(2):121-36.

Carter JR, Ray CA, Downs EM, Cooke WH. Strength training reduces arterial blood pressure but not sympathetic neural activity in Young normotensive subjects. *J Appl Physiol*. 2003; 94:2212-6.

Casavant MJ, Blake K, Griffith J, Yates A, Copley LM. Consequences of use of anabolic androgenic steroids. *Pediatr Clin North Am*. 2007; 54:677-90.

Celotti F, Negri Cesi P. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 43(5):469-77.

Chaves EA, Pereira-júnior PP, Fortunato RS, Masuda MO, de Carvalho AC, de Carvalho DP, *et al.* Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 99(4-5): 223-30.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB*. 1991; 5(15): 3037-46.

Clark BM, Schofiels RS. Dilated cardiomyopathy and acute liver injury associated with combined use of ephedra, gamma-hydroxybutyrate, and anabolic steroids. *Pharmacotherapy*. 2005; 25(5): 756-61.

Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol*. 1991; 260(1): H136-45.

Costanzo LS. *Fisiologia*. Ed. Guanabara Coogan. 1. ed. 1999; p. 135.

Creutzberg EC, Schols AM. Anabolic Steroids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999; 2(3): 243-53.

Cunha TS, Cunha NS, Moura MJCS, Marcondes FK. Esteróides anabólicos e a prática desportiva. *Braz J Pharmac Sci*. 2004; 40(1): 165-9.

Cunha TS, Moura MJCS, Bernardes CF, Tanno AP, Marcondes FK. Vascular sensitivity to phenylefrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment.

Hypertension. 2005a;46:1-6.

Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 2005b;77:1030-43.

D'Andrea A, D'Andrea L, Caso P, Scherillo M, Zeppilli 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.* 2006; 23:149-57.

Delp MD, Laughlin MH. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med Sci Sports exerc.* 1997; 29:1454-61.

Driesen RB, Verheyen FK, Debie W, Blaauw E, Babiker FA, Cornelussen RNM, et al. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(5):896-908.

Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Meyer RR, Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cel Biochem.* 2003; 251:51-9.

Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci LR, Turillazzi E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125:253-5.

Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001; 8:125-42.

Garcia JAD, Incerpi EK. Fatores e Mecanismos Envolvidos na Hipertrofia Ventricular Esquerda e o Papel Anti-Hipertrófico do Óxido Nítrico. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(6): 443-450.

Gelfand MM, Wita B. Androgen and estrogen-androgen hormone replacement therapy: a review of the safety literature. *Clin Ther.* 1997; 19(3): 383-404.

Gordon CM, Glowacki J, LeBoff MS. DHEA and the skeleton (through the ages). *Endocrine.* 1999; 11(1):1-11.

Grace F, Sculthorpe N, Baker J, Davies B. Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS). *J Sci Med Sport.* 2003; 6(3): 307-312.

Grogan S, Shepherd S, Evans R, Wright S, Hunter G. Experiences of anabolic steroids use: In-depth interviews with men and woman bodybuilders. *J Health Psychol.* 2006; 11:845-56.

Gruber AJ, Pope JHG. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother Psychosom.* 2000; 69(1): 19-26.

Guzzoni V. Efeitos vasculares do esteróide anabólico nandrolona em ratos submetidos a treinamento físico resistido de alta intensidade. Dissertação de Mestrado. 2010. FOP/UNICAMP.

Hart G. Exercise-induced cardiac hypertrophy: a substrate for sudden death in athletes? *Exper Physiol*. 2003; 85:639-44.

Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med*. 2004; 34:513-54.

Izumo S, Nadal-ginard BE, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(2):339-43.

Jin H, Yang R, LiW, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, *et al*. Effects of exercise training on cardiac function, gene expresión, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(6): H2994-3002.

Johansen DL, Painter PL, Sacas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T. Effects of resistance exercise training and nandrolona decanoate on body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: A randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(8): 2307-14.

Johnson WO. Steroids: a problem of huge dimensions. *Sports Illust*. 1995; 5(13): 38-54.

Juberg EN, Minneman KP, Abel PW. Beta 1- and beta 2-adrenoceptor binding and functional response in right and left atria of rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1985; 330:193-202.

Kannel WB. Epidemiological aspects of arterial hypertension. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1977; 47(3):320-8.

Kasikcioglu E, Oflaz H, Arslan A, Topcu B, Kasikcioglu HA, Umman B, *et al*. Aortic elastic properties in athletes using anabolic-androgenic steroids. *Int J Cardiol*. 2007; 114:132-4.

Kelley GA, Kelley KS. Progressive resistance exercise and resting blood pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Hypertension*. 2000;35:838-843.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:11-34.

Kramer J. Appreciation of the clinical documentation of Deca-Durabolin. Organon International B.V. – Products Information Group – Doc. 1990, 5283A.

Krege JH, Hodgins JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff

- system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*. 1995; 25:1111-5.
- Krieger JK. Hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca. *Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo*. 1995; 5: 3.
- Kuhn CM. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res*. 2002; 57:411-34.
- Kuipers H, Peeze BFM, Hartgens F, Wijnen JA, Keizer HA. Muscle ultrastructure after strength training with placebo or anabolic steroid. *Can J Appl Physiol*. 1993; 18(2): 186-96.
- Kuipers H, Wijnen JA, Hartgens F, Willems SM. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int J Sports Med*. 1991; 12(4): 413-8.
- Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: A review for the clinician. *Sports Med*. 2002; 32(5):285-96.
- Landsberg L, Young JB. Catecholamines and the adrenal medulla. In: *Williams textbook of endocrinology*. Wilson JD & Foster DW (Ed), 1992.
- Lee SD, Tzang BS, Kuo WW, Lin YM, Yang AL, Chen SH, Tsai FJ, Wu FL, Lu MC, Huang CY. Cardiac fas receptor-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15(10):2407-15.
- Machida S, Kariya F, Kobayashi K, Narusawa M. Lack of effect of running training at two intensities on cardiac myosin isozyme composition in rats. *Japan J Physiol*. 2000; 50(6): 577-83.
- Maior AS, Menezes P, Pedrosa RC, Carvalho DP, Soares PP, Nascimento JH. Abnormal cardiac repolarization in anabolic androgenic steroid users carrying out submaximal exercise testing. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37:1129-33.
- Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8: 63-75,
- Molinoff PB, Wolf BB, Weiland GA. Quantitative analyses of drug-receptor interactions. I. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sci*. 1981;29:427-43.
- Monteiro MF, Filho DCS. Exercício físico e o controle da pressão arterial. *Rev Bras Med Esporte*. 2004; 10(4): 513-16.
- Moore R. Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Ann Med*. 1998; 30 (supl 1):46-53.
- Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Molecular basis of cardiac performance: Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest*. 1989; 84(6): 1693-700.

Namakanov BA, Rasulov MM, Mitrokhina NE, Valeeva DR, Karaulova LK. Myocardial hypertrophy of the left ventricle during familial arterial hypertension. *Bul Exp Biol Med.* 2005; 140:675-6.

Negrão CE, Rondon MRPB. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2001; 8:89-95.

Norton GR, Trifunovic B, Woodiwiss AJ. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *Eur J Appl Physiol.* 2000; 81:310-6.

Nottin S, Nguyen LD, Terbah M, Obert P. Cardiovascular effects of androgenic anabolic steroids in male bodybuilders determined by tissue Doppler imaging. *Am J Cardiol.* 2006; 97:912-5.

Nourani FRR, Spadari RC, De Moraes S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: Effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen Pharmac.* 1992; 23:787-91.

Oliveira EM, Alves GB, Brum PC, Krieger JE. Aspectos moleculares da hipertrofia dos músculos cardíaco e esquelético após o treinamento físico. In: Negrão CE, Barreto CP. *Cardiologia do Exercício.* Ed. Manole; 2. ed. 2006; p.56-79.

Oliveira EM, Krieger JE. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico. Aspectos moleculares. *Hipertensão.* 2002; 5(2):73-8.

Parker TG, Schneider MD. Growth factors, protooncogenes, and plasticity of the cardiac genome. *Ann Rev Physiol.* 1991; 53: 179-200.

Pássaro LC, Godoy M. Reabilitação cardiovascular na hipertensão arterial. *Rev Socesp.* 1996; 6:45-58.

Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry.* 1988;145:487-90.

Ray CA, Carrasco DI. Isometric handgrip training reduces arterial pressure at rest without changes in sympathetic nerve activity. 2000; *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H245-9.

Ribeiro PCP. O uso indevido de substâncias: esteróides anabolizantes e energéticos. *Adolesc Latinoam.* 2000; 2(2):97-101.

Riebe D, Fernhall B, Thompson PD. The blood pressure response to exercise in anabolic steroid users. *Med Sci Sports Exer.* 1992; 24(6):633-7.

Rivera-Arce JC, Morales-Crespo L, Vargas-Pinto N, Velázquez KT, Jorge JC. Central

effects of the anabolic steroid 17 alpha methyltestosterone in female anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 84(2):275-81.

Rocha FL, Carmo EC, Roque FR, Hashimoto NY, Rossoni LV, Frimm C, et al. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H3575-83.

Rogatto GP. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos wistar. Tese de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. 2001; p.181.

Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B, Musso E. Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol Behav.* 1996; 60:1397-401.

Schaible TF & Scheuer J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. *J Appl Physiol.* 1979; 46(4):854-60.

Scheinowitz M, Kessler-Icekson G, Freimann S, Zimmermann R, Schaper W, Golomb E, *et al.* Short-and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Horm IGF Research.* 2003; 13(1):19-25.

Schwartz PJ, Zaza A, Locati EH, Moss AJ. Stress and sudden death. *Circulation* 1991; 83(Suppl II): 71-80.

Silva GJJ, Krieger JE. Hipertrofia ventricular esquerda na hipertensão arterial. *Hipertensão.* 2000; 3(4):156-60.

Snyder EM, Beck KC, Dietz NM, Eisenach JH, Joyner MJ, Turner ST, et al. Arh16Gly polymorphism of the beta2-adrenergic receptor is associated with differences in cardiovascular function at rest and during exercise in humans. *J Physiol.* 2006; 571:121-30.

Stolt A, Karila T, Viitasalo M, Mäntysaari M, Kujala UM, Karjalainen J. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *Am J Cardiol.* 1999; 84(3):364-6.

Stone MH, Fleck SJ, Triplett NT, Kraemer WJ. Health- and performance-related potential of resistance training. *Sports Med.* 1991; 11(4):210-31.

Stratton JR, Levy WC, Cerqueira MD, Schwartz RS, Abrass IB. Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in health men. *Circulation.* 1994; 89(4):1648-55.

Tanner SM, Miller DW, Alongi C. Anabolic steroid use by adolescents: prevalence, motives, and knowledge of risks. *Clin J Sport Med.* 1995; 5(2):108-15.

Tanno AP. Alterações cardíacas induzidas por esteróide anabólico androgênico em ratos sedentários e treinados. Tese de Doutorado. 2007. IB/UNICAMP.

Tanno AP, Cunha TS, Sampaio MJC, Marcondes FK. Relação entre exercício físico de alta intensidade e o lactato sanguíneo, em ratos. Saúde em Revista. 2006; 8:23-29.

Tanno AP, Giordano FCL, Cunha TS, Calil CM, Rosa K, Irigoyen MC, Marcondes FK. Efeitos cardíacos do decanoato de androlona em ratos sedentários e treinados. 4º Congresso Científico Latino Americano de educação Física (CD-ROM) – FACIS/UNIMEP, Piracicaba/SP, 2006a.

Tanno AP, Neves VJ, Rosa KT, Cunha TS, Giordano FC, Calil CM, et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: Role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. Life Sci. 2011; 89(17-18):631-7.

Tanno AP, Rosa K, Cunha TS, Giordano FCL, Calil CM, Marcondes FK. Evaluation of the cardiac function in rats treated with high dose of nandrolone. XXIII Congresso Latinoamericano de Ciências Fisiológicas. Physiological Mini-reviews. 2006b; 2(4): 46.

Thiblin I, Runeson B, Rajs J. Anabolic androgenic steroids and suicide. Ann Clin Psychiatry. 1999; 11(4): 223-31.

Tylicki A, Kawalko A, Sokolska J, Strumilo S. Effect of anabolic steroid nandrolone decanoate on the properties of certain enzymes in the heart, liver, and muscle of rats, and their effect on rats' cardiac electrophysiology. Horm Metab Res. 2007; 39(4):268-72.

Urhaunsen A, Albers T, Kindermann W. Are the cardiac effects of anabolic steroids abuse in strength athletes reversible? Heart. 2004; 90:496-501.

Voltera AF, Cesaretti ML, Ginoza M, Jr OK. Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. Arq Bras Endocrinol Metab. 2008; 52(1):47-54.

Yesalis CE. Anabolic steroids in sport and exercise. Champaign, IL, Human Kinetics. 1993; 325p.

Wilson JD. Androgen abuse by athletes. Endocr Rev. 1988; 9(2):181-99.

Woodiwiss AJ, Trifunovic B, Philippides M, Norton GR. Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. J Appl Physiol. 2000; 88(2): 409-15.

Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. Clin Chem. 1997; 43(7): 1289-92.

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

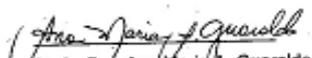
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 944-1, sobre "RESPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTERÓIDE ANABÓLICO NANDROLONA, ASSOCIADO A TREINAMENTO FÍSICO ANAERÓBICO" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de dezembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 944-1, entitled "CARDIOVASCULAR RESPONSES TO THE ASSOCIATION BETWEEN THE TREATMENT WITH ANDROGENIC ANABOLIC STEROID AND ANAEROBIC PHYSICAL TRAINING", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 12, 2005.

Campinas, 12 de dezembro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Afonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZWYERNO VAZ
CEP - 13 081-972 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 51 35 3766-5359
FAX 51 35 32892124

ANEXO 2 - Cópia da primeira página do artigo científico publicado, referente aos resultados obtidos nas análises dos genes marcadores de hipertrofia cardíaca.

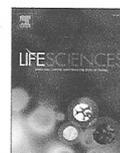
Life Sciences 89 (2011) 631–637



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Life Sciences

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



Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: Role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology

Ana Paula Tanno ^{a,1}, Vander José das Neves ^{a,1}, Kaleizu Teodoro Rosa ^b, Tatiana Sousa Cunha ^{a,c},
Fernanda Cristina Linarello Giordano ^a, Caroline Morini Calil ^a, Vinicius Guzzoni ^a, Tiago Fernandes ^d,
Edilamar Menezes de Oliveira ^d, Pedro Duarte Novaes ^e, Maria Cláudia Irigoyen ^b,
Maria José Costa Sampaio Moura ^f, Fernanda Klein Marcondes ^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

^b Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, SP, Brazil

^c Science and Technology Institute, Federal University of São Paulo, SP, Brazil

^d Laboratory of Biochemistry, School of Physical Education and Sports, University of São Paulo, SP, Brazil

^e Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

^f Life Sciences Center, Pontifical Catholic University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2011

Accepted 27 July 2011

Keywords:

Cardiac hypertrophy

Genes

Training

Collagen

Echocardiography

Nandrolone

ABSTRACT

Aims: This study was conducted to assess the isolated and combined effects of nandrolone and resistance training on cardiac morphology, function, and mRNA expression of pathological cardiac hypertrophy markers. **Main methods:** Wistar rats were randomly divided into four groups and submitted to 6 weeks of treatment with nandrolone and/or resistance training. Cardiac parameters were determined by echocardiography. Heart was analyzed for collagen infiltration. Real-time RT-PCR was used to assess the pathological cardiac hypertrophy markers.

Key findings: Both resistance training and nandrolone induced cardiac hypertrophy. Nandrolone increased the cardiac collagen content, and reduced the cardiac index in non-trained and trained groups, when compared with the respective vehicle-treated groups. Nandrolone reduced the ratio of maximum early to late transmitral flow velocity in non-trained and trained groups, when compared with the respective vehicle-treated groups. Nandrolone reduced the alpha-myosin heavy chain gene expression in both non-trained and trained groups, when compared with the respective vehicle-treated groups. Training reduced the beta-myosin heavy chain gene expression in the groups treated with vehicle and nandrolone. Only the association between training and nandrolone increased the expression of the skeletal alpha-actin gene and atrial natriuretic peptide in the left ventricle.

Significance: This study indicated that nandrolone, whether associated with resistance training or not, induces cardiac hypertrophy, which is associated with enhanced collagen content, re-expression of fetal genes in the left ventricle, and impaired diastolic and systolic function.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) comprise a group of drugs commonly used among athletes, frequently in combination with resistance training (Kuhn, 2002). Although the increase in muscle mass and power induced by AAS (Bhasin et al., 1996) is still questionable (Parkinson and Evans, 2006), it has been well established that AAS abuse

is associated with detrimental side effects (Sullivan et al., 1998). Several researchers have observed that AAS may induce pathological left ventricular hypertrophy (Pärssinen et al., 2000a; Nottin et al., 2006), with disproportionate extracellular collagen accumulation and interstitial fibrosis (Nieminen et al., 1996; Palatini et al., 1996; Rocha et al., 2007). On the other hand, some reports have shown no differences in left ventricular morphofunction between AAS users and non-users (Thompson et al., 1992; Pärssinen et al., 2000b). These conflicting data may be related to the difficulty of finding athletes who admit the exact pattern of AAS administration. Moreover, not only the type and regimen of AAS administration, but the additional influence of dietary intake and patterns and/or training intensity may have different effects on individual subjects (Parkinson and Evans, 2006). Although there have been conflicting results and uncertainty as regards the underlying

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, FOP/UNICAMP, Av. Limeira, 901, 13414-903 Piracicaba, SP, Brazil. Tel.: +55 19 2106 5380; fax: +55 19 2106 5212.

E-mail address: fklein@fop.unicamp.br (F.K. Marcondes).

¹ These two authors contributed equally to this study.