

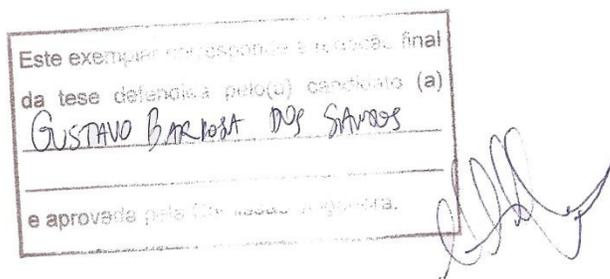
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**GUSTAVO BARBOSA DOS SANTOS**

**“Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos submetidos ao exercício de natação”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Sa59m**

Santos, Gustavo Barbosa dos  
Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações  
cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos  
submetidos ao exercício de natação / Gustavo Barbosa dos  
Santos. – Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Miguel Arcanjo Areas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Estanozolol. 2. Melatonina. 3. Natação – Aspectos  
Fisiológicos. 4. Estresse oxidativo. 5. Eletrocardiograma. I.  
Areas, Miguel Arcanjo, 1952-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Melatonin effect on cardiovascular parameters in disabled pulmonary arterial hypertension monocrotaline induced rats.

**Palavra-chave em inglês:** Stanozolol; Melatonin; Swimming – Physiological aspects; Oxidative stress; Electrocardiography.

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Miguel Arcanjo Areas, Dora Maria Grassi-Kassisse, Carlos Alberto da Silva.

**Data da defesa:** 26/02/2010

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 26 de Fevereiro de 2010

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Assinatura

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Luiz Antônio e Neide, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas minhas decisões, fossem elas quais fossem. Pelo exemplo de honestidade, ética e justiça que sempre me deram. Vocês são os principais responsáveis pela realização deste trabalho e pela pessoa que sou. Amo vocês, muito obrigado.

A toda minha família, em especial ao meu irmão Rafael, pessoa fundamental em minha vida. Com ele aprendi o verdadeiro sentido da palavra "irmandade". É meu irmão, companheiro e melhor amigo. Conte comigo sempre.

Aos meus grandes amigos Fernando Catanho e Renato Buscariolli. Pessoas que contribuem muito em minha vida acadêmica e pessoal. Espero que nossa amizade perdure para sempre, assim como nossas "boleiragens".

À Lisa, pessoa muito importante em minha vida, apesar do pouco tempo que nos conhecemos. Obrigado pela sua ajuda e pelo seu carinho.

Aos amigos da AABB, Valter César e Paulo André, Vinícius (Burns), Fernando (Juv), Vitor (Mundinho), por fazerem parte da minha vida há tanto tempo e serem exemplos de amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, meu orientador, por tudo que passamos nesses sete anos de convivência. Sem dúvida, aprendi muito com ele pelo lado acadêmico, mas não se compara com o que aprendi pelo lado pessoal: com sua humildade, respeito com que trata a todos, pela sua amizade e lealdade. Sempre será uma grande referência para mim, posso dizer que o tenho como um dos meus "Paraninfos".

Ao Prof. Dr. Edson Delattre, pelas oportunas sugestões metodológicas que ajudaram a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dora Maria Grassi-Kassisse por disponibilizar seu laboratório, pelos seus ensinamentos e por ter aceitado ao convite para fazer parte da minha banca. Muito Obrigado. Agradeço também aos seus alunos Tiago Martinelli (Tim) e Danilo Crege, pela amizade formada durante esse período e pelos (muitos) momentos de descontração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina C. G. Marcondes pela gentileza de nos ceder seu laboratório para realização de parte dos procedimentos experimentais, por ter aceitado ao convite para fazer parte da minha banca, e às suas alunas Emilianne, sempre solícita e principalmente à Estela, pois sem ela, esse trabalho não teria sido realizado. Muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, por ter me dado a honra de tê-lo em minha banca, pelas correções e sugestões, contribuindo de maneira extremamente significativa para a melhoria da qualidade desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes por ter aceitado prontamente ao convite para participar desta banca.

Aos amigos de laboratório Fernanda, Brígida, Luis Alberto, Clodoaldo, Francisco (Chico), pelas risadas e tudo que passamos na sala do Miguel e especialmente ao Marcelo, pela sua grande ajuda neste trabalho. Obrigado.

Ao departamento de Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp e a todos seus funcionários, assim como aos funcionários da secretaria de pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E por último, porém mais importante, à Deus que me deu o dom da vida e guia meus passos.

## Sumário

Abstract.....	13
1. Introdução.....	14
1a. Esteróides Anabólicos Androgênicos: aspectos gerais .....	14
1b. Esteróides Anabólicos Androgênicos e Coração .....	17
1c. Exercício e Estresse Oxidativo.....	19
1d. Esteróides Anabólicos Androgênicos e Estresse Oxidativo.....	23
1e. Melatonina.....	24
2. Objetivos.....	27
2a. Objetivo Geral .....	27
2b. Objetivos Específicos .....	27
3. Metodologia.....	28
3a. Animais .....	28
3b. Grupos Experimentais .....	28
3c. Treinamento de Natação.....	28
3d. Administração de Estanozolol (EST).....	29
3e. Administração da Melatonina (MEL) .....	29
3f. Peso de Tecidos e Órgãos.....	29
3g. Peso Corpóreo .....	30
3h. Eletrocardiograma (ECG) .....	30
3i. Pressão Arterial .....	30
3j. Análises Bioquímicas.....	31
3k. Cortes Histológicos do Fígado e Coração .....	31
3l. Análise Estatística .....	31
4. Resultados e Discussão.....	32
5. Conclusões.....	61
6. Referências Bibliográficas.....	62
7. Anexo .....	75

## Lista de Figuras

**Figura 1a** – Frequência Cardíaca (bpm) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) antes e após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e/ou MEL. Resultados expressos como média ± desvio padrão; \* $p < 0,05$  comparados com valores pré-treinamento. Teste t,  $n=5$ . ..... 32

**Figura 1b** – Frequência Cardíaca (bpm) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) antes e após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e/ou MEL. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ . .... 33

**Figura 1c** – Variação do peso corporal (g) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de treinamento e/ou tratamento. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ . ..... 34

**Figura 2** – Pressão Arterial Sistólica e Diastólica (mmHg) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de tratamento e/ou treinamento. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ . ..... 36

**Figura 3** – Peso Relativo (g/100g de peso corpóreo) do coração dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de período experimental. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ . ..... 39

**Figura 4** – Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM), corados com H-E, com aumento de 40x, após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Observam-se núcleos íntegros, dispostos periféricamente e ausência de processos inflamatórios, características de tecido cardíaco normal. .... 42

**Figura 5** – Área dos cardiomiócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ ..... 43

**Figura 7** – Duração do Intervalo QRS (ms) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtido através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ ..... 46

**Figura 8** – Duração do Intervalo QT e QTc (ms) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtido através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ ..... 48

**Figura 9** – Peso Relativo (g/100g de peso corpóreo) do fígado dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de treinamento e/ou tratamento com EST e MEL. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ ..... 50

**Figura 10** – Fotomicrografia de corte transversal do fígado dos ratos dos grupos sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM), corados com H-E, com aumento de 40x, após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Observam-se, hepatócitos aumentados com núcleos deslocados para a periferia e alterações citoplasmáticas sugestivas de inclusão lipídica, granulações nucleares indicativas de picnose nos grupos SE, TE e em menor magnitude nos grupos SEM e TEM. .... 52

**Figura 11** – Atividade da enzima Fosfatase Alcalina hepática ( $\text{nmol} \cdot \mu\text{g de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ ..... 54

**Figura 12** – Atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase cardíacas e hepáticas ( $\text{nmol} \cdot \mu\text{g de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidas através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ . ..... 57

## Resumo

Esteróides androgênicos anabolizantes (EAA) são indicados clinicamente para promover aumento da síntese protéica após queimaduras, cirurgias, radioterapia, no tratamento contraceptivo, no hipogonadismo, na osteoporose, na sarcopenia relacionada à idade e à pacientes portadores de HIV. Por outro lado, o uso indiscriminado dos EAA, com intuito de aumentar o desenvolvimento muscular, o desempenho físico, a capacidade aeróbia, a tolerância ao treinamento de alta intensidade e até mesmo para fins estéticos, é crescente entre atletas e esportistas recreacionais. O uso abusivo de EAA está relacionado à toxicidade cardíaca e hepática em consequência do aumento do estresse oxidativo. Por outro lado, estudos apontam a melatonina como substância com significativa ação antioxidante, apresentando efeitos benéficos no tratamento de doenças cardíacas. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da melatonina sobre biomarcadores do estresse oxidativo e parâmetros cardiovasculares e hepáticos em ratos adultos sedentários ou treinados com natação e tratados com estanozolol. Os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos: sedentário (S), sedentário+estanozolol (SE), sedentário+estanozolol+melatonina (SEM), treinado (T), treinado+estanozolol (TE) e treinado+estanozolol+melatonina (TEM). Realizou-se avaliação eletrocardiográfica no início e ao final do período experimental (6 semanas), sendo, então, determinada a pressão arterial, atividade de enzimas antioxidantes e da fosfatase alcalina e histologia do coração e do fígado. Os resultados mostraram que o estanozolol provocou bradicardia, queda do peso relativo do fígado e aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase cardíaca e hepática, catalase cardíaca e fosfatase alcalina hepática. Quando associado ao treinamento, estanozolol aumentou a pressão arterial sistólica e diastólica, o peso relativo do coração, desviou o eixo elétrico cardíaco para esquerda e provocou alterações hepatotóxicas. A administração da melatonina nos ratos tratados com EST, por sua vez, impediu o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e da atividade das enzimas catalase cardíaca, fosfatase alcalina hepática além de impedir o desvio do eixo elétrico cardíaco causado pela hipertrofia ventricular esquerda induzida pelo estanozolol. Além

disso, melatonina reduziu as alterações nos hepatócitos induzidas pelo estanozolol. Concluímos que, em nossas condições experimentais, a melatonina atenuou os efeitos adversos ao sistema cardiovascular e ao fígado causados pelo uso de doses supra-fisiológicas de estanozolol.

**Palavras-Chave:** Estanozolol, Melatonina, Natação, Estresse Oxidativo, Eletrocardiograma, Pressão Arterial.

## Abstract

Anabolic androgenic steroids (AAS) are nominated for clinical use to promote protein synthesis after burns, surgery, radiotherapy, on contraceptive treatment, osteoporosis, hypogonadism, age-related sarcopenia and HIV patients. However, the indiscriminate use of ASS aiming to stimulate muscular development, physical performance, aerobic capacity, tolerance to high-intensity training and with aesthetic purpose is increasing among athletes and recreational sportsmen. The abusive use of ASS is related to oxidative stress-induced cardiac and hepatic toxicity. Nonetheless, many studies point to melatonin as a substance with antioxidant properties, with beneficial effects on cardiovascular diseases treatment. The purpose of this study was to assess melatonin's effects on oxidative stress biomarkers, cardiovascular and liver parameters in stanozolol-treated trained rats. Rats were divided into the following groups: sedentary (S), sedentary+stanozolol (SS), sedentary+stanozolol+melatonin (SSM), trained (T), trained+stanozolol (TS) and trained+stanozolol+melatonin (TSM). Electrocardiography assessment were performed at the beginning and at the end of experimental period, and then, blood pressure, antioxidant enzymes and phosphatase alkaline activities, heart and liver histology were determined. Stanozolol induced bradycardia, relative liver weight decreased and increased cardiac and liver superoxide dismutase, cardiac catalase and liver phosphatase alkaline activities. Stanazolol plus training induced increased systolic and diastolic blood pressure, relative heart weight, left cardiac axis deviation and toxic liver damage. Melatonin induced decreased systolic and diastolic blood pressure, cardiac catalase and liver phosphatase alkaline activities, and prevented stanazolol-induced left cardiac axis deviation. Furthermore, melatonin decreased stanozolol-induced liver damage. In conclusion, under our experimental conditions, the side effects of supraphysiology doses of stanozolol on liver and cardiovascular system are mitigated by melatonin.

**Keywords:** Stanozolol, Melatonin, Swimming, Oxidative Stress, Electrocardiogram, Blood Pressure.

## 1. Introdução

### 1a. Esteróides Anabólicos Androgênicos: aspectos gerais

Esteróides anabólico-androgênicos (EAA) são uma família de hormônios que incluem a testosterona (hormônio sexual masculino) e seus derivados sintéticos, os quais possuem tanto efeitos anabólicos quanto androgênicos. Assim, estimulam o crescimento muscular e a função do sistema reprodutor masculino através das suas propriedades farmacocinéticas, biodisponibilidade e balanço entre suas atividades androgênicas e anabólicas (BATES et al., 1987; MARQUES, et al., 2003; KANAYAMA, HUDSON & POPE, 2008).

As ações da testosterona são resultados da combinação de diversos mecanismos. Primeiramente, ela liga-se ao seu receptor (receptor androgênico) para exercer sua atividade androgênica e anabólica. Segundo, ela pode também, ser reduzida pela enzima 5  $\alpha$ -redutase a 5  $\alpha$ -dehidrotestosterona (DHT), a qual atua em receptores androgênicos presentes em determinados tecidos alvo, incluindo o trato urogenital, pele, fígado, glândulas sebáceas, cérebro e coração. Desse modo, o uso de doses suprafisiológicas de esteróides anabolizantes, afeta não somente a atividade muscular esquelética como também a de diversos sistemas e órgãos. Além disso, a testosterona pode ser aromatizada a estradiol no tecido adiposo, ósseo e no cérebro e, assim, exercer atividade estrogênica, podendo levar, por exemplo, a um quadro de ginecomastia (crescimento de tecido mamário em homens). Essas duas últimas ações são altamente indesejáveis para usuários de substâncias anabólicas, uma vez que a redução da testosterona a DHT diminui a razão anabólico/androgênica do esteróide, além de poder levar à feminilização (AMORY & BREMNER, 2000; KHUN, 2002; EVANS, 2004).

O efeito anabólico dos EAA é mediado, pelos receptores androgênicos no músculo esquelético. Acreditava-se que os receptores androgênicos estariam saturados em níveis fisiológicos de testosterona e que o fornecimento de um suplemento exógeno desse hormônio não traria nenhum benefício adicional. Porém, estudos recentes demonstraram que o número de receptores androgênicos pode ser aumentado pela exposição ao EAA e/ou pelo treinamento de força (SINHA-HIKIM et al., 2004; BARRY et al., 2009). Isso sugere um provável

mecanismo pelo qual doses suprafisiológicas de EAA e exercício podem complementar um ao outro (DOUMIT, COOK & MERCKEL, 1996; EVANS, 2004). Além disso, EAA competem pelos receptores de glicocorticoesteróides, causando um efeito anti-catabólico por bloquear a diminuição da síntese protéica causada pelos glicocorticoesteróides durante treinos de alta intensidade (MARAVELIAS et al., 2005; KHUN, 2002; KICMAN, 2008).

Enquanto os esteróides endógenos são essenciais para as funções homeostáticas do organismo, os esteróides exógenos podem ser usados para aumentar a massa muscular através de processos de hipertrofia e hiperplasia celular, reduzir a gordura corpórea, aumentar a retenção de nitrogênio muscular, normalizar a função sexual, no tratamento da endometriose, câncer de mama, osteoporose, na distrofia muscular, além de aliviar sintomas da depressão e reduzir efeitos decorrentes de hipogonadismo, condição patológica em que a produção de testosterona encontra-se reduzida (FALANGA et al., 1998; LISE, et al., 1999; FRIEDL, 2000). São esteróides exógenos: cipionato de testosterona, enantoato de testosterona, propionato de testosterona, metandrostenolona, oxandrolona e estanozolol, entre outros (KHUN, 2002).

A atividade anabólica da Testosterona é primeiramente manifestada em sua ação miotrófica, resultando em aumento da força e da massa muscular. Tal fato, em conjunto com os efeitos estimulatórios dos andrógenos no sistema nervoso central (SNC), traz um sentimento de euforia e aumento da agressividade, levando a um grande aumento do uso dos EAA por atletas de todos os níveis, assim como por esportistas recreacionais, com objetivo de melhorar o desempenho em competições ou simplesmente com propósitos estéticos. (MARAVELIAS et al., 2005).

Dessa forma, alguns atletas que praticam esportes anaeróbios, como fisiculturistas, por exemplo, fazem uso de esteróides para aumentar a massa muscular e reduzir a gordura corpórea. Similarmente, outros competidores de levantamento de peso utilizam EAA para aumentar a massa muscular e estimular o sistema nervoso, permitindo, assim, não só o aumento do nível de força como o desenvolvimento de potência de arranque (explosão) muscular. Atletas de

*endurance* utilizam esteróides sintéticos para impedir a redução dos esteróides endógenos consequente ao treinamento intenso, proporcionando, assim, um efeito protetor anti-catabólico (ELASHOFF et al., 1991; BAUME et al., 2006).

Em relação aos efeitos ergogênicos dos EAA nos esportes de resistência, Tamaki et al. (2001), observaram aumento na concentração de noradrenalina no hipotálamo dos ratos tratados com EAA, sugerindo que esse estado “hiperadrenérgico” poderia resultar em aumento do débito cardíaco, redução da resistência vascular periférica e em aumento do fluxo sanguíneo, contribuindo, assim, para o aumento da resistência aeróbia observada nesses animais.

Entretanto, a presença dos esteróides em altas concentrações no organismo pode ter como consequência efeitos indesejáveis (LAMB, WEGEL & MARCELLI, 2001; KHUN, 2002; MARQUES et al. 2003; MARAVELIAS et al., 2005; KICMAN, 2008), tais como:

1. *Feedback* negativo para os hormônios gonadotróficos hipotalâmicos e consequente redução da produção de testosterona e espermatozóide devido à atrofia gonadal;
2. Acne, devido à estimulação das glândulas sebáceas da pele;
3. Distribuição de pêlos segundo padrão masculino;
4. Comportamento agressivo, devido à excitação do sistema nervoso central;
5. Arritmias cardíacas;

Nas mulheres, os esteróides anabolizantes provocam alterações significativas, tais como alteração do timbre da voz, hipertrofia do clitóris, irregularidade menstrual, redução da gordura corporal, aumento de pêlo facial, aumento da libido, comportamento agressivo e aumento do apetite. Algumas dessas alterações são irreversíveis, tais como hipertrofia clitoriana e voz grave, enquanto que alterações menstruais, acne e lipídeos plasmáticos podem ser reversíveis (LISE et al., 1999; GRUBER & POPE, 2000; MARAVELIAS et al., 2005).

## **1b. Esteróides Anabólicos Androgênicos e Coração**

Apesar dos efeitos positivos dos EAA na melhoria do desempenho físico, vários estudos demonstram que doses suprafisiológicas de EAA aumentam o risco de doenças cardiovasculares, como arritmias, elevação da pressão arterial, alteração nas concentrações de lipídeos plasmáticos (aumento da concentração de colesterol total e LDL, redução na concentração de HDL), redução do tempo de coagulação sanguínea, policitemia, isquemia cardíaca, trombose, infarto do miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (SULLIVAN et al., 1998; LISE et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2004; BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005; CHAVES et al., 2006).

Estudos relacionam, ainda, o uso de esteróides anabolizantes com distúrbios na condução de impulsos elétricos cardíacos, apoptose miocárdica e ocorrência de morte súbita (FINESCHI et al., 2001 apud MELCHERT; WELDER, 1995; ZAUGG et al., 2001; URHAUSEN et al., 2004; KIERZKOWSKA et al., 2005; DU TOIT et al., 2005; KHUN, 2002; MARAVELIAS et al., 2005; LUNZ et al., 2006; PAYNE, KOTWINSKI & MONTGOMERY, 2004; EVANS, 2004; PEREIRA-JUNIOR et al., 2006; FINESCHI et al., 2007). Além disso, os esteróides parecem estar envolvidos na regulação fina da responsividade vascular a diferentes substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, evidenciando o importante efeito deletério dos EAA sobre a função cardiovascular em oposição aos efeitos benéficos da terapia hormonal substitutiva (SILVA et al., 2002).

Um estudo feito por Doumit, Cook & Merckel. (1996), verificou que, a administração crônica de testosterona aumenta a resposta máxima vascular ao KCl e às prostaglandinas, enquanto que a nandrolona promove inibição da resposta vasodilatadora endotélio-dependente devido à inibição ou *down-regulation* do receptor relacionado à guanilil-ciclase. Por outro lado, a testosterona promove relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina e atenua a resposta contrátil subsequente à fenilefrina.

Quando combinado ao exercício, o uso prolongado de EAA tem mostrado uma mudança da hipertrofia cardíaca fisiológica para uma hipertrofia cardíaca patológica (ZAUGG, 2001).

Acredita-se que a hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício ocorra devido ao aumento da pré-carga (enchimento diastólico) do coração (DU TOIT et al., 2005), enquanto que o mecanismo exato da hipertrofia cardíaca induzida pelos EAA, não está totalmente esclarecido. Além disso, esse mesmo estudo mostra que essa hipertrofia não foi necessariamente acompanhada por aumento da eficiência cardíaca uma vez que houve queda de função mecânica cardíaca em ratos tratados com doses supra-fisiológicas de EAA e submetidos ao exercício de natação.

Estanozolol (EST) é um éster da testosterona [17- beta-hidróxi-17-alfa-metilandrostan-3,20-dione] que possui um grande potencial anabólico e uma degradação hepática mais lenta do que o hormônio masculino natural. (CLARCK et al., 1998; PEY et al., 2003).

O EST é utilizado na medicina no tratamento auxiliar de várias doenças, como na endometriose, no estímulo da eritropoiese em algumas anemias, na aceleração da cicatrização em grandes traumas ou cirurgias, na sarcopenia em pacientes com HIV e na terapia do hipogonadismo masculino. Atletas também utilizam o EST, em altas doses, com objetivo de melhorar o desempenho físico (FALANGA et al., 1998; BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005).

O efeito do medicamento se manifesta com aumento do apetite e da massa magra corpórea e significativa melhora do metabolismo protéico. O EST é pouco androgênico e possui acentuada ação anabólica, podendo, porém, promover atrofia testicular e retenção hídrica, elevando assim a pressão arterial (BAUME et al., 2006 apud BROEDER 2003; HARTGENS et al., 2004). O extenso metabolismo dos EAA orais leva à hepatotoxicidade importante.

A administração de esteróides exógenos diminui a secreção de esteróides endógenos por um mecanismo de retroalimentação negativa (MARQUES et al., 2003 apud HAYNES JR. & MURAD, 1987). Estudos comprovam que a metandienona (um anabolizante sintético) leva à diminuição da excreção de esteróides endógenos (MARQUES et al., 2003 apud MARECK et al., 1998). Além disso, este esteróide possui alto grau de hepatotoxicidade sendo muito utilizado por apresentar pouca aromatização (conversão de um hormônio andrógeno em um

estrógeno) e pode causar perdas acentuadas de força e volume muscular imediatamente após a interrupção do seu uso (KHUN, 2002).

A icterícia decorrente do uso dos EAA deve-se a estase e acúmulo da bile em porções centrais dos lóbulos hepáticos, sem obstrução dos ductos maiores. Por outro lado, tem sido relatado possibilidade ocorrência somente após 2 a 5 meses de tratamento (LISE et al., 1999). Em um estudo de caso feito por Yoshida et al. (1994), foi observado que um indivíduo apresentou sintomas de icterícia colestática após 4 semanas de uso do EST.

Estudos demonstram que, ao contrário da grande maioria dos EAA, o EST parece diminuir o nível de agressividade de seus usuários (MCGINNIS et al., 2001; MCGINNIS et al., 2002; CUNNINGHAM & MCGINNIS, 2007). Alterações de humor ocasionadas pelo uso dessas substâncias podem ser muito prejudiciais, principalmente, em adolescentes.

A consistência desses efeitos argumenta fortemente quanto a necessidade de rígidos critérios para a utilização clínica dos esteróides anabolizantes e da total contra-indicação como recurso meramente anabólico ou estético.

### **1c. Exercício e Estresse Oxidativo**

As células de organismos aeróbios obtêm a energia necessária para sua atividade biológica a partir da oxidação de substratos metabólicos, tais como carboidratos, gorduras e proteínas, usando o  $O_2$  comoceptor final de elétrons, sendo que esse processo catabólico pode gerar radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Radicais Livres são espécies atômicas ou moleculares altamente reativas que contêm um elétron não-pareado, o que contribui para sua alta reatividade. RLs reagem rapidamente com a molécula estável mais próxima, capturando o elétron necessário para que a molécula ganhe estabilidade estrutural química. A molécula “atacada” perde um de seus elétrons, se tornando um radical livre. Os RLs podem lesar componentes celulares vitais, como ácidos nucleicos,

membranas celulares e mitocôndria, resultando em morte celular (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007). Como todos os organismos aeróbios utilizam oxigênio durante a respiração celular, a geração dos RLs por reações celulares bioquímicas a pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial é inevitável.

Em condições fisiológicas, a maioria das EROs é produzida na CTE mitocondrial, uma vez que, 90% do consumo de  $O_2$  pelo nosso organismo ocorre na mitocôndria (JI, 1999). No repouso, para cada 25 moléculas de  $O_2$  reduzidas à água pela respiração mitocondrial, ocorre uma redução incompleta de  $O_2$ , gerando EROs (MÓRAN et al., 2004 apud MCCORD 1979).

No entanto, as EROs também são produzidas pelas células em outras vias bioquímicas, por exemplo, durante o metabolismo dos neutrófilos para fagocitar bactérias, vírus e outros xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo) (LEEUEWENBURGH & HEINECKE, 2001). Além disso, a produção de  $H_2O_2$  pode ser aumentada substancialmente quando há grande quantidade de gordura sendo metabolizada pela  $\beta$ -oxidação. Existem, ainda, outras vias de transferência de elétron, que na presença de oxigênio pode aumentar em muito a produção de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  como, por exemplo, a oxidação de D-aminoácidos, ativação do citocromo  $P_{450}$ , a degradação da xantina a ácido úrico e a autooxidação das catecolaminas (JI, 1999).

As espécies reativas podem também ser derivadas do Nitrogênio. A óxido nítrico sintase catalisa a síntese da espécie radicalar óxido nítrico (NO) na conversão de arginina à citrulina (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007). O NO, por si só, não reage com a maioria das membranas celulares, porém se torna tóxico quando é convertido em uma espécie reativa de nitrogênio (ERNs). As ERNs agem facilitando reações de nitrosilação. A mais rápida reação de nitrosilação conhecida para o NO é a combinação desta molécula com um ânion superóxido formando peróxinitrito ( $ONOO^-$ ), um potente agente oxidante, que em pH fisiológico é rapidamente protonado à ácido peróxinitroso, causando dano direto às proteínas, lipídeos e DNA.

EROs e ERNs são, portanto, produtos do metabolismo celular fisiológico, possuindo um duplo papel, podendo ser nocivo ou benéfico para o organismo. Um

grande número de funções fisiológicas é controlado por essas moléculas, incluindo a regulação do tônus vascular, defesa contra microorganismos invasores e células nocivas, monitoramento da tensão de oxigênio no controle da ventilação e na produção de eritropoetina, e atuando como mediador e modulador de sinalização molecular (ASCENSÃO et al., 2007; BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007).

Para se protegerem do papel nocivo das EROs, os organismos aeróbios desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante, que inclui um mecanismo enzimático e outro mecanismo não-enzimático de defesa. A produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante devem estar em perfeito equilíbrio para evitar um desequilíbrio na relação formação/eliminação de EROs. As principais enzimas envolvidas na eliminação das EROs são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Além do sistema antioxidante enzimático, existem antioxidantes não-enzimáticos, que neutralizam as EROs devido à capacidade de doar elétron às espécies reativas de oxigênio. Os mais conhecidos antioxidantes não-enzimáticos são: vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ascorbato), glutathione (GSH),  $\beta$ -caroteno e melatonina (TOMÁS-ZAPICO & COTO-MONTES, 2005; QIAO, HOU & LIU 2006).

A superóxido dismutase, primeira linha de defesa contra radicais livres derivados do oxigênio, catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Este ( $H_2O_2$ ) pode ser transformado em  $H_2O$  e  $O_2$  pela catalase que está presente nos peroxissomos das células eucarióticas. O sistema antioxidante dependente da glutathione consiste em glutathione reduzida (GSH) e outras enzimas fundamentais na defesa celular contra radicais livres e outras espécies oxidativas. Dessas enzimas, a glutathione peroxidase é uma selenoproteína que reduz hidroperóxidos, assim como o  $H_2O_2$  enquanto oxida a glutathione. Um grande número de xenobióticos eletrofílicos tóxicos (como alguns carcinogênicos, bromobenzeno, clorobenzeno) está conjugado ao grupo nucleofílico da glutathione pela glutathione S-transferase (GSTs) presente em grandes quantidades no citosol das células. A GST, assim como a GPx, pode também catalisar reações reduzindo peróxidos. A redução da glutathione oxidada (GSSG) à GSH é mediada pela

enzima GSSG redutase (GRD), que usa NADPH como o agente redutor (GUL, et al. 2006; POWERS & SEN, 2000).

O desequilíbrio entre a produção de RLs e sua eliminação é denominado Estresse Oxidativo (EO) e Estresse Nitroativo. O EO pode causar lesão tecidual e tem sido relacionado a um grande número de doenças crônico-degenerativas (BUONOCORE & GROENENDAAL, 2007).

A conversão do oxigênio, durante o metabolismo normal, aos subprodutos peróxido de hidrogênio, superóxido e radical hidroxila ocorre por adição sucessiva de elétrons ao oxigênio. Posto que o exercício aumenta a taxa de consumo de oxigênio pelos tecidos e pelo organismo como um todo, tem sido sugerido que o exercício físico pode causar aumento do EO e lesão tecidual (LIU et al., 2000).

No músculo, as mitocôndrias são uma das fontes de espécies reativas, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e possivelmente o radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ). A descoberta de que a mitocôndria produz óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), aumenta as evidências de que o exercício físico poderia elevar o EO através da ativação mitocondrial durante o exercício. Além disso, neutrófilos podem infiltrar-se nos músculos esqueléticos após exercícios excêntricos ou muito intensos, aumentando o dano celular por EO (LEEUEWENBURGH & HEINECKE, 2001).

Um efeito favorável da atividade física regular poderia ser a modificação da relação pró-oxidante/antioxidante, aumentando a atividade antioxidante endógena e diminuindo o estresse oxidativo. Por outro lado, atividade física aguda aumenta o consumo de  $O_2$  e a produção de radicais livres, o que poderia aumentar o estresse oxidativo (ELOSUA et al., 2003).

Vários estudos têm mostrado uma relação direta entre o exercício físico e o aumento do EO (LIU et al., 2000; NAKAO et al., 2000; PINHO et al., 2006; GOMEZ-CABRERA et al., 2006; KNEZ et al., 2007). Um estudo realizado por Ji (1999) mostrou que o exercício de alta intensidade pode causar aumento na produção de RLs nos músculos esquelético e no músculo cardíaco. Porém, Liu et al. (2000) não observaram aumento estatisticamente significativo do EO em corações de animais exercitados quando comparados aos animais controle.

O coração, assim como outros tecidos, possui um sistema enzimático e não-enzimático para neutralizar as EROs. Porém, o músculo cardíaco pode ser especialmente vulnerável ao EO por possuir um alto consumo de oxigênio e por estar em atividade contínua. Além disso, o sistema antioxidante cardíaco não é muito eficiente se comparado a alguns músculos esqueléticos. (MÓRAN et al., 2004 apud LEEUWENBURGH, 1999; ASCENSÃO et al., 2003).

#### **1d. Esteróides Anabólicos Androgênicos e Estresse Oxidativo**

Já que o tratamento prolongado com o esteróide anabolizante estanozolol provoca disfunção nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e no sistema monooxigenase, seria provável que essas alterações fossem acompanhadas por aumento na geração de EROs (PEY et al., 2003). Esse tipo de risco deveria ser acentuado durante a realização de exercícios concomitantemente ao tratamento com EAA.

Um estudo feito por Pansarasa et al. (2002), verificou aumento de biomarcadores de EO em músculos esqueléticos de ratos sedentários tratados com EAA. Ainda, nesse mesmo estudo, os autores verificaram que os ratos treinados e tratados com EAA tiveram uma pequena adaptação mitocondrial positiva que não poderia ser explicada pelos efeitos isolados do treinamento ou do tratamento com EAA.

Em outro estudo, feito especificamente com estanozolol, Pey et al. (2003) demonstraram aumento da peroxidação lipídica hepática em ratos tratados (treinados ou não) com EST e da atividade de algumas enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), indicando aumento do EO hepático. Os autores não encontraram, porém, aumento de biomarcadores de peroxidação lipídica (TBARS) no plasma, músculo esquelético ou cardíaco.

Além disso, Lunz et al. (2006), não observaram alteração na expressão da *heat shock protein* (HSP) 72 (proteínas associadas ao estresse celular) em corações de ratos exercitados e tratados com EAA.

## **1e. Melatonina**

A melatonina (MEL) vem despertando grande interesse da pesquisa científica devido aos seus efeitos clínicos no sistema cardiovascular (Šimko & Paulis 2007). Entretanto, os resultados obtidos em modelos com diferentes níveis analíticos (diferença entre espécies de animais, dosagem, concentração, etc.) são um tanto quanto controversos e os mecanismos pelos quais a MEL atua sobre o sistema cardiovascular ainda não estão completamente entendidos.

A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) é a principal substância secretada pela glândula pineal. Em humanos, a ação da MEL está fortemente associada com o ciclo claro/escuro como, por exemplo, a consolidação do sono, regulação do ritmo circadiano e da temperatura corporal (TOMÁS-ZAPICO & COTO-MONTES, 2005; BERRA & RIZZO, 2009).

Além da pineal, a melatonina também pode ser secretada em menor quantidade pela retina, trato gastrointestinal e em resposta à quantidade e ao tipo de alimento que ingerimos (TEIXEIRA, 2003).

Esse neurohormônio é secretado na fase de ausência de luz e é o sinalizador biológico do escuro (ou seja, quando a pineal libera MEL, informa ao organismo que está escuro) e como tal está obviamente correlacionado com o sono em espécies de atividade diurna, como a humana. Entretanto, devido ao fato da secreção de MEL ocorrer à noite tanto em animais de atividade diurna (que dormem a noite) quanto em animais de atividade noturna (que dormem de dia), é pouco plausível que haja relação causal direta entre o sono e a melatonina. De fato, a MEL pode levar a uma propensão ao sono (sonolência), mas não o induz diretamente (MARKUS, JUNIOR & FERREIRA, 2003).

A MEL é um produto do metabolismo do triptofano e possui natureza tanto lipofílica quanto hidrofílica, o que contribui significativamente para sua passagem através das biomembranas (sem que seja necessária a ligação com algum receptor específico), podendo, assim, exercer sua ação em estruturas citosólicas ou nucleares (DOBSAK et al., 2003, BERRA & RIZZO, 2009). A MEL age, também, através de dois subtipos diferentes de receptores de proteína-G: MT1 e

MT2 e ainda via um receptor de membrana chamado quinona oxidoreductase 2 (MT3) (TAMURA et al., 2006).

Além disso, a MEL pode modular a transmissão de sinais cálcio dependentes devido à sua fixação à calmodulina e assim influenciar no sistema da adenilil-ciclase e fosfodiesterase (DOBSAK et al., 2003). Essa ligação da MEL com a calmodulina pode, também, ser um mecanismo molecular pelo qual a MEL inibe a formação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (TAMURA et al., 2006). A MEL pode ainda, modular diretamente os canais de cálcio voltagem-dependente no coração e isso poderia influenciar a fisiologia do mesmo (DOBSAK et al., 2003). Em estudo recente, Hussain (2007), demonstrou que a administração de MEL inibe a absorção de colesterol e poderia ser um auxiliar no tratamento da hipercolesterolemia, por diminuir o colesterol plasmático, o perfil lipoprotéico e o conteúdo lipídico do fígado.

Com respeito ao sistema vascular, tem sido demonstrado que a MEL interfere na contratilidade vascular agindo diretamente sobre a musculatura vascular lisa ou indiretamente, potencializando a vasoconstrição disparada pela estimulação adrenérgica, nos receptores  $\alpha$ -1 ou receptores serotoninérgicos (REITER et al., 2003 apud REITER, 1998).

Além de todas essas funções, a MEL, segundo alguns estudos, atua também no tratamento do câncer, pois estimula a atividade anti-mitótica do sistema imune, participa da regulação da fisiologia gastrintestinal, da função cardiovascular, da função renal, da função reprodutora e da fisiologia óssea além de possuir funções antiinflamatórias (REITER et al., 2003; JARZYNKA et al., 2006).

Assim, desde 1993, quando foi descoberta a função antioxidante da MEL, o interesse em seu uso clínico vem crescendo significativamente. Em alguns casos, a eficácia da MEL como antioxidante supera a da GSH e da vitamina E (TOMÁS-ZAPICO & COTO-MONTES, 2005).

Segundo Reiter et al. (2003), a ação antioxidante da MEL parece agir por diferentes vias:

1. Como neutralizador direto de RL;
2. Como antioxidante indireto via estimulação de enzimas antioxidantes;

3. Aumentando a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial e reduzindo o vazamento de elétrons (diminuindo, com isso, a geração de RLs);
4. Aumentando a eficiência de outros antioxidantes;

Segundo Tengattini et al. 2008, a virtual ausência de toxicidade da MEL possibilita seu uso em longo prazo.

Entretanto, existem alguns efeitos colaterais decorrentes da administração da MEL, como dor de cabeça, tontura, náusea e sonolência. Além disso, o uso da MEL exógena parece ser segura em tratamentos de curto prazo (até 3 meses), mas há pouca informação disponível sobre seu uso em longo prazo (BERRA & RIZZO, 2009). Anisimov (2003), em sua revisão sobre os efeitos da MEL exógena, traz conclusões opostas à maioria dos autores estudados e alerta para outros possíveis efeitos adversos do uso da MEL exógena: infertilidade, hipotermia, lesão na retina, diminuição da libido em homens, hipertensão arterial, diabetes, tumores cancerígenos e indução ao aumento da depressão em indivíduos suscetíveis. Ainda, segundo o autor, a MEL pode ser perigosa para indivíduos com fatores de riscos cardíacos e não deve ser administrada em pessoas com desordens do sistema imune (incluindo alergias severas, artrite reumatóide, linfoma), doença mental severa, ou pessoas que utilizam hormônios esteróides.

## **2. Objetivos**

Considerando-se o uso frequente de esteróides anabolizantes por atletas, com fins competitivos e por indivíduos não-atletas, com fins estéticos, bem como os efeitos da melatonina no sistema cardiovascular, este trabalho teve por objetivo:

### **2a. Objetivo Geral**

Determinar o efeito do esteróide anabólico estanozolol sobre parâmetros cardiovasculares e hepáticos em ratos Wistar adultos sedentários e submetidos ao treinamento físico de natação;

Avaliar o uso da melatonina como substância antioxidante em ratos tratados com estanozolol, submetidos ou não ao treinamento físico de natação;

### **2b. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito do estanozolol e do tratamento com melatonina sobre os seguintes parâmetros dos grupos experimentais:

1. Peso relativo de órgãos e tecidos;
2. Atividade elétrica cardíaca;
3. Pressão Arterial;
4. Histologia hepática e cardíaca;
5. Atividade de enzimas antioxidantes;

### **3. Metodologia**

#### **3a. Animais**

Foram utilizados 30 ratos Wistar adultos (aproximadamente 10 semanas de vida e 300g), provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, no Biotério do setor de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, recebendo água e ração “ad libitum” (ração sólida, Purina Nutrientes Ltda) em ambiente com temperatura em torno de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp aprovou o protocolo experimental sob o número 1649-1.

#### **3b. Grupos Experimentais**

Após período de adaptação de sete dias, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais com cinco ratos em cada grupo:

- a) Ratos controles sedentários – Grupo S;
- b) Ratos sedentários + Estanozolol – Grupo SE;
- c) Ratos sedentários + Estanozolol + Melatonina – Grupo SEM;
- d) Ratos Treinados com natação – Grupo T;
- e) Ratos Treinados com natação + Estanozolol – Grupo TE;
- f) Ratos Treinados + Estanozolol + Melatonina – Grupo TEM;

#### **3c. Treinamento de Natação**

Os grupos de animais treinados foram submetidos a um protocolo de natação, adaptado de Radak et al. (2006). Os grupos exercitados realizaram exercício de natação cinco vezes por semana durante seis semanas, em tanque de vidro (85 x 56 x 60 cm) com temperatura da água de  $31 \pm 1^\circ \text{C}$ . Os treinos eram realizados entre às dez e onze horas da manhã. Submetemos os ratos a uma semana de adaptação ao exercício para evitar interferências causadas pelo estresse (AZEVEDO, 1994). Nessa semana houve aumento gradual do volume da sessão de treino, iniciando com sessões de 10 minutos de nado livre, com incremento de 10 minutos a cada 2 dias, para que se acostumassem à profundidade e ao esforço (AZEVEDO, 1994). A duração da sessão de treino na

segunda semana foi de 60 minutos, com aumento de 30 minutos na sessão de treino, a cada semana, chegando a 180 minutos na sexta e última semana.

O treinamento de natação foi escolhido para que o trauma muscular causado pela corrida prolongada em esteira, o exercício estimulado por choque elétrico e a contração excêntrica fossem evitados, uma vez que qualquer um desses fatores, por si só, poderia levar ao aumento do estresse oxidativo. Foi utilizado o exercício de natação em grupo por este promover uma intensidade de exercício maior do que a natação individual (NAKAO et al., 2000).

Após o treinamento os animais eram colocados em gaiolas coletivas sob um aquecedor elétrico além de serem secados individualmente com uma toalha antes de serem recolocados em suas respectivas gaiolas. Esse procedimento foi realizado para minimizar a perda de ratos por possíveis doenças e morte.

### **3d. Administração de Estanozolol (EST)**

A dose clínica de EST para humanos é de  $(0,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{semana}^{-1})$ . Os grupos SE, TE, SEM e TEM receberam injeção de alta dose de estanozolol ( $5\text{ mg/kg}$  peso corpóreo), antes da sessão de natação, cinco vezes por semana ( $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{semana}^{-1}$ ), em solução salina, subcutaneamente, enquanto os grupos S e T receberam somente o veículo aquoso (CLARK et al., 1998; BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005).

### **3e. Administração da Melatonina (MEL)**

Os grupos TEM e SEM receberam injeção intraperitoneal de melatonina ( $10\text{mg/kg}$ ), cinco vezes por semana, durante seis semanas. As injeções foram aplicadas por volta das 10 horas (aproximadamente 30 minutos antes do início da sessão de natação). Os demais grupos receberam somente solução salina (ACIKEL et al. 2003; YEUNG, HUNG & FUNG, 2008).

### **3f. Peso de Tecidos e Órgãos**

Após o período experimental de 6 semanas (42 dias) os animais foram sacrificados através de aprofundamento da anestesia e após a determinação das pressões arteriais. Coração e fígado foram retirados para determinação do peso fresco absoluto e relativo ( $\text{g}/100\text{g}$  peso corpóreo) desses órgãos.

### **3g. Peso Corpóreo**

A determinação foi realizada semanalmente, em balança para pesagem de animais com precisão de 1 grama, sempre à mesma hora, permitindo então, a avaliação do ganho de peso corpóreo.

### **3h. Eletrocardiograma (ECG)**

Vinte e quatro horas após o término do protocolo de natação, os ratos foram anestesiados com Ketamina + Xilazina (90mg/kg e 10mg/kg de peso corporal, através de injeção intramuscular), mantidos em posição supina, com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade 2N e velocidade de 50mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeletrica definido como segmento TP. O QTd foi calculado em valores absolutos, subtraindo o intervalo QT mais curto do mais longo ( $QTd = QT \text{ max} - QT \text{ min}$ ). Esse valor foi convertido em porcentual (% QTd) pela correção do QTd pelo intervalo QT mais curto e multiplicando este valor por 100 ( $\%QTd = QT_{\text{max}} - QT_{\text{min}}/QT_{\text{min}} \times 100$ ). O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ) (RIBEIRO-FILHO et al., 2000; KHAN et al., 2007) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ( $QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$ ). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (COSTA et al., 2008).

### **3i. Pressão Arterial**

A determinação das pressões arteriais sistólica e diastólica foi realizada após o ECG com equipamento BP-1-Analog single-channel transducer signal conditioner (World Precision Instruments, Sarasota, FL), através de cânula inserida na artéria femoral esquerda dos ratos. A calibração foi executada utilizando-se manômetro de pressão (modelo PM-015), (KANG et al., 2006).

### **3j. Análises Bioquímicas**

Homogeneizado de amostras do coração e do fígado foram utilizados para determinar a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e fosfatase alcalina.

Para análise da fosfatase alcalina foi utilizado o reagente de *4-nitrophenyl phosphato disodium* (p-NPP, 37mM) como substrato e a atividade da enzima foi determinada nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos por espectrofotometria, expressa em nmol/μg proteína (MARTINS et al., 2001).

A atividade da catalase foi medida como descrita por Cohen et al. (1970) utilizando-se triton X-100 para solubilizar a catalase e aumentar seu nível observável. Peróxido de hidrogênio foi adicionado a cada amostra para iniciar a reação, após 3 minutos, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi adicionado para parar a reação, em seguida foi utilizado permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), que ao reagir com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) forma complexo que será lido em 480nm, os resultados foram expressos em unidades por mg de proteína utilizada.

A determinação da atividade da superóxido dismutase foi feita em homogeneizado tecidual avaliando-se a redução do NTB (*nitro blue tetrazolium*) pelo ânion superóxido, gerado pela hipoxantina/xantina oxidase à 37° C. A inibição da reação pela SOD, foi seguida espectrofotometricamente, monitorando a formação de formazan à 560nm (WINTERBOURN et al., 1975).

### **3k. Cortes Histológicos do Fígado e Coração**

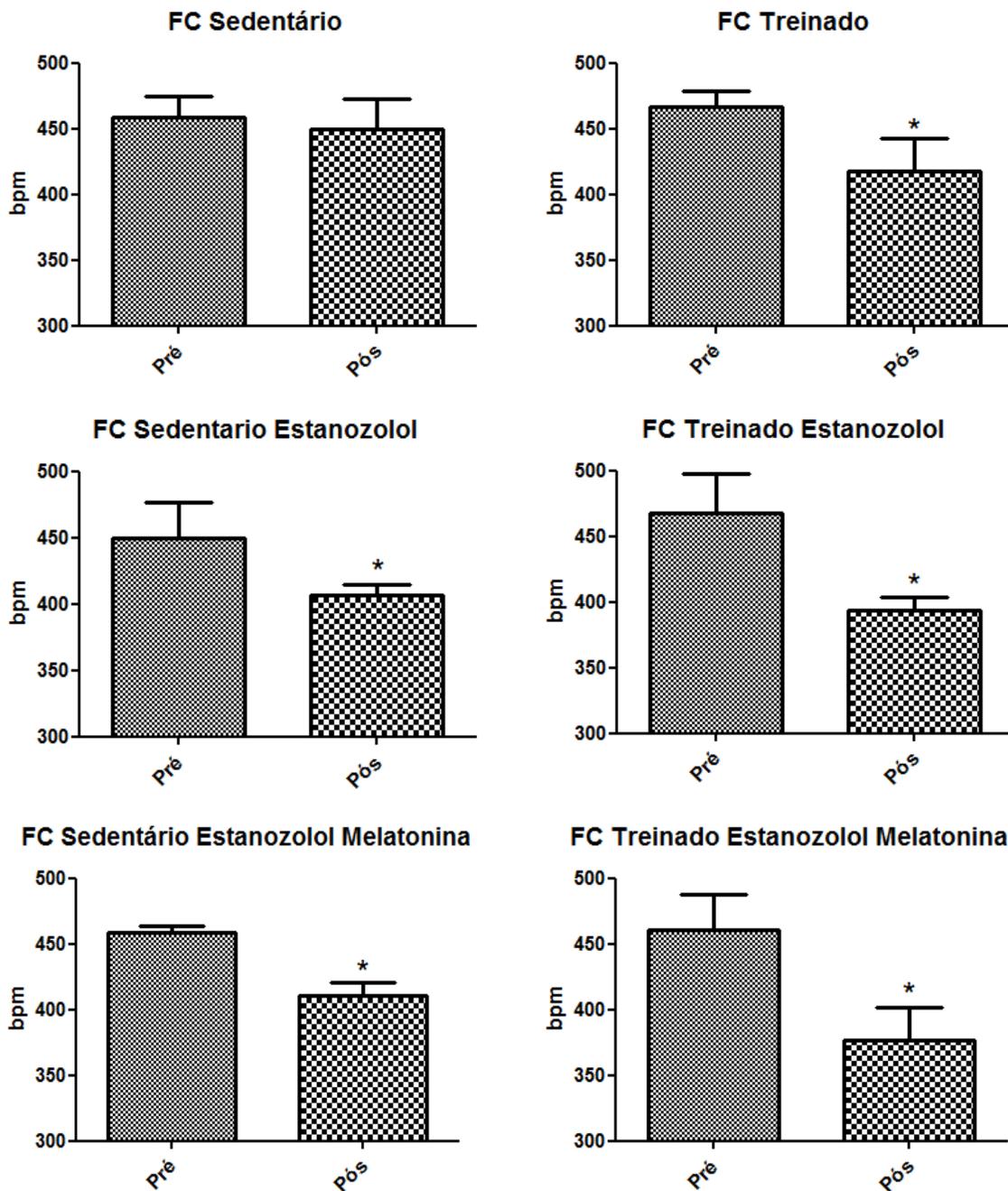
Os cortes histológicos do coração e fígado foram corados com hematoxilina-eosina (H-E) para análise histológica no microscópio Leica (40X) e utilizando-se do *software* Image Pro Plus, para determinação de dimensões.

### **3l. Análise Estatística**

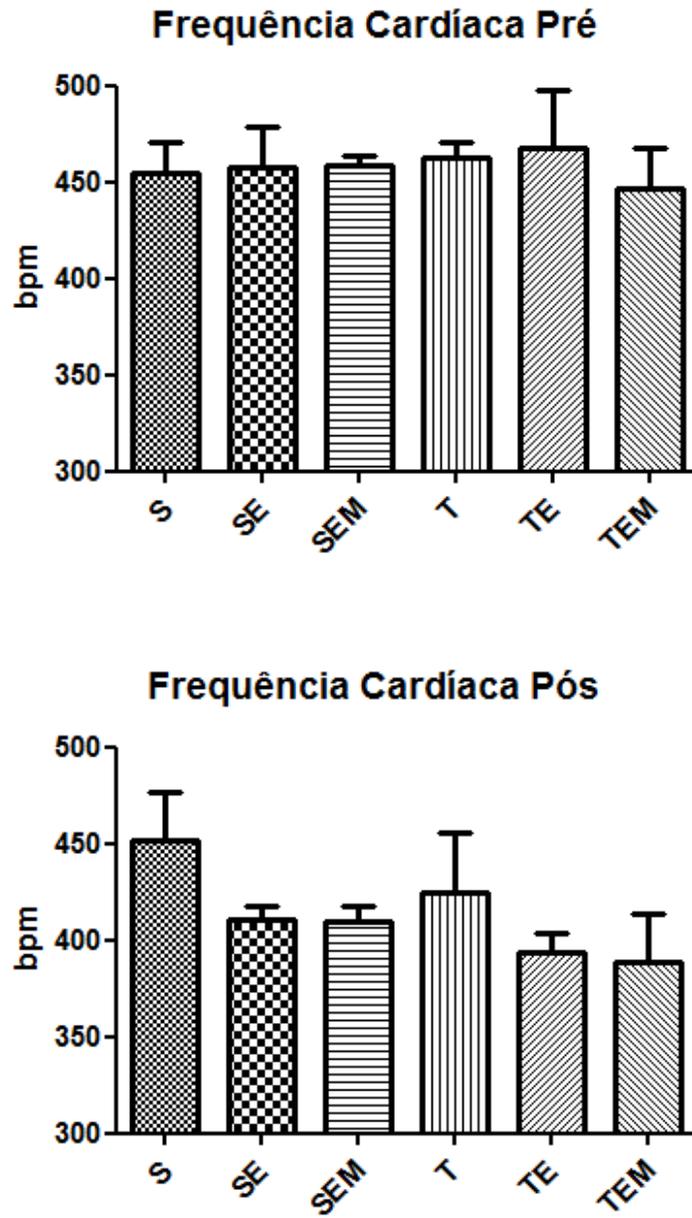
Diferenças estatísticas foram calculadas através da análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey para estabelecimento das diferenças entre os grupos. Para comparação de variações de um mesmo grupo no início e ao final do período experimental utilizou-se o Teste “t” de *Student* pareado através do *software* Prisma (Graphpad Software Inc., USA). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

#### 4. Resultados e Discussão

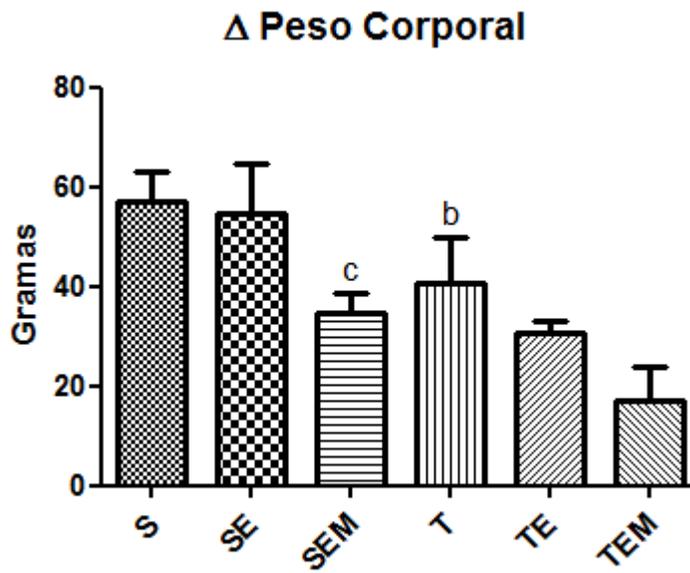
As figuras 1a e 1b mostram a frequência cardíaca (FC) basal dos ratos dos grupos experimentais.



**Figura 1a** – Frequência Cardíaca (bpm) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) antes e após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e/ou MEL. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; \* $p < 0,05$  comparados com valores pré-treinamento. Teste t,  $n=5$ .



**Figura 1b** – Frequência Cardíaca (bpm) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) antes e após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e/ou MEL. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ .



**Figura 1c** – Variação do peso corporal (g) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de treinamento e/ou tratamento. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ .

Não houve diferença estatística na comparação da frequência cardíaca entre os grupos experimentais (**figura 1b**), mostrando que os grupos eram homogêneos no início do experimento. A comparação da frequência cardíaca após o período experimental mostrou tendência de queda da FC dos ratos dos grupos SE e T em relação ao grupo S e do grupo TE em relação ao grupo T, porém sem diferença estatística.

A análise da frequência cardíaca quando comparada com o próprio grupo, no início e ao final do período experimental, mostrou que tanto o treinamento de natação quanto o tratamento com EST e MEL reduziram significativamente a FC de repouso (grupos SE, SEM, T, TE e TEM).

A bradicardia de repouso induzida pelo treinamento é uma das adaptações ao exercício mais estudadas em animais e humanos. A redução da FC de repouso no grupo treinado comprova a eficiência do protocolo de treinamento proposto neste estudo. Essa adaptação possui grande relevância em relação à saúde por

estar associada a um menor consumo de oxigênio pelo miocárdio e maior volume sistólico (MEDEIROS et al., 2004).

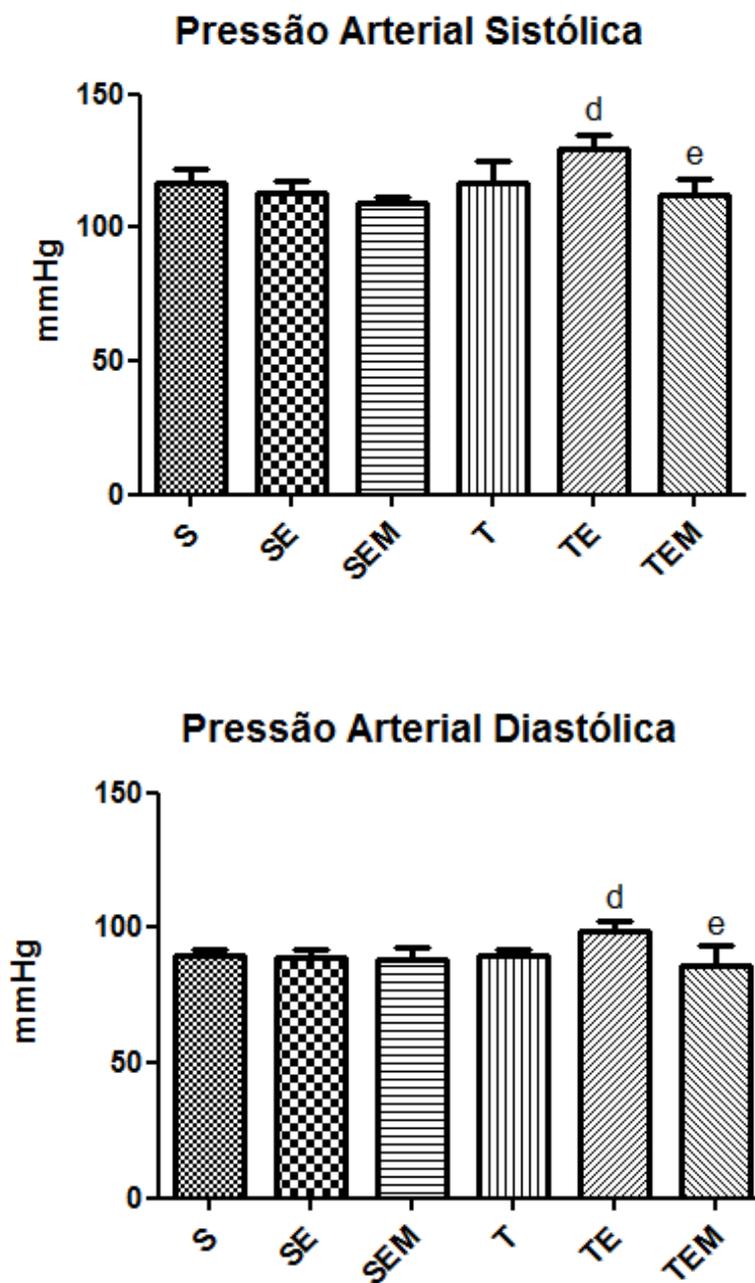
Essa bradicardia de repouso consequente ao treinamento proposto pode estar relacionada a um ajuste do sistema nervoso autônomo, por aumento do tônus vagal e, em alguns casos, diminuição do tônus simpático, o que leva a uma menor incidência de arritmias cardíacas (MEDEIROS et al., 2004; IELLAMO et al., 2002).

Com relação aos efeitos do EST, nossos resultados estão de acordo com Beutel, Bergamaschi & Campos (2005) que também observaram diminuição na frequência cardíaca em ratos tratados com este mesmo EAA.

O mecanismo pelo qual o EST modula a função barorreflexa não está bem esclarecido, porém existem algumas hipóteses a esse respeito: Pouliot et al. (1996) mostraram que esteróides anabolizantes podem passar pela barreira hematoencefálica e agir no SNC, através de receptores androgênicos específicos existentes na região que controla as funções cardiovasculares. Dessa forma, a testosterona pode agir no tronco encefálico, em neurônios vagais pré-ganglionares, modulando a atividade do centro cardiomotor e, conseqüentemente, o tono simpático e parassimpático sobre o coração (EL-MAS et al. 2001).

Com relação a MEL, cremos que esta possa ter contribuído para a redução da FC de repouso, já que a MEL atua no SNC, melhorando a resposta do reflexo barocepor, reduzindo o tônus simpático e diminuindo a FC. Resultados obtidos em nosso laboratório verificaram queda da FC em ratos tratados com MEL por trinta dias (RAMOS, 2010). De fato, a modulação da atividade do SNC pela MEL, que altera o tono simpático, pode representar um mecanismo protetor ao sistema cardiovascular contra uma estimulação simpática excessiva, reduzindo assim a frequência cardíaca (SIMKO et al. 2009).

A **figura 2** apresenta os resultados da Pressão Arterial Sistólica e Diastólica dos grupos experimentais.



**Figura 2** – Pressão Arterial Sistólica e Diastólica (mmHg) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de tratamento e/ou treinamento. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do test de Tukey,  $n=5$ .

Nossos resultados mostraram que o EST associado ao treinamento aumentou a pressão arterial sistólica e diastólica (grupo TE). Por outro lado, a administração de MEL preveniu o aumento das pressões no grupo submetido ao treinamento e tratamento com EST (grupo TEM).

A falta de uma resposta hipotensiva no grupo treinado está de acordo com vários estudos que mostraram não haver queda significativa da pressão arterial em ratos normotensos submetidos a exercício de natação (MEDEIROS 2004). Assim, o efeito hipotensivo do exercício não parece ser significativo em indivíduos normotensos (O'SULLIVAN & BELL, 2000).

A literatura disponível não é conclusiva a respeito dos efeitos dos EAA sobre a pressão arterial. De modo geral, doses suprafisiológicas de EAA parecem elevar a pressão arterial (KICMAN, 2008). Agentes androgênicos parecem afetar mais a pressão arterial do que os agentes anabólicos, porém o mecanismo exato ainda precisa ser estabelecido (HARTGENS & KUIPERS, 2004). Entretanto, se ocorre elevação da pressão arterial, ela parece ser pequena e transitória, indicando que o impacto na saúde é limitado ao período de administração da droga.

Nossos resultados são corroborados, também, por Hartgens et al. (2004), que encontrou aumento da pressão arterial em atletas submetidos à administração de EAA. Ainda segundo Hartgens, essa alteração da pressão arterial pode ocorrer dentro de quatro semanas após o início da administração do EAA por dois motivos: 1) estimulação da eritropoiese pelo EAA, levando ao aumento do hematócrito e, conseqüentemente, ao aumento da viscosidade do sangue; 2) aumento da atividade simpática devido à administração de EAA (BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005).

Por outro lado, a MEL se mostrou eficiente em prevenir o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica dos ratos treinados e tratados com EST (grupo TEM).

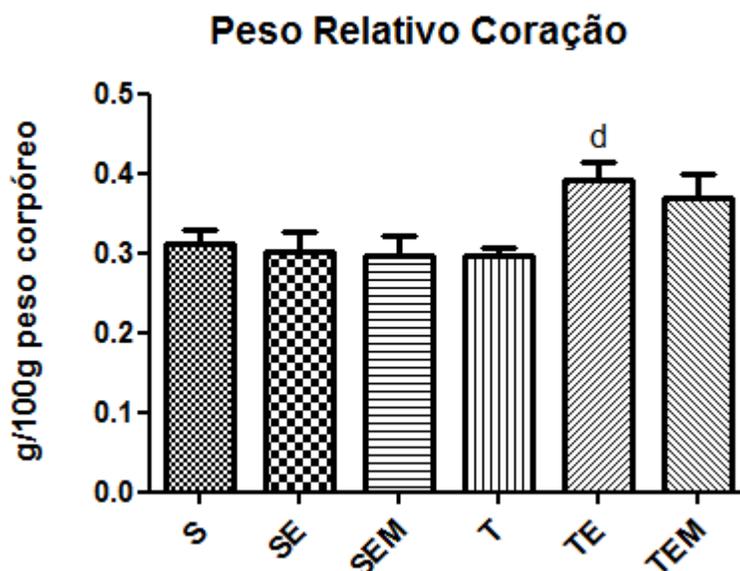
A administração da MEL tem sido relacionada com a diminuição da pressão arterial através de vários mecanismos, tais como efeito hipotalâmico direto, diminuição dos níveis de catecolaminas, relaxamento da musculatura lisa e,

principalmente, devido às propriedades antioxidantes da MEL (PAULIS & SIMKO, 2007; TENGATTINI, et al., 2008).

Em outro experimento, com ratos espontaneamente hipertensos tratados com MEL, a redução da pressão arterial e da frequência cardíaca foi associada ao aumento da vasodilatação endotélio-dependente e da sensibilidade ao inibidor de óxido nítrico sintase (NOS), sugerindo melhora da sinalização do óxido nítrico (NO). Essa hipótese é reforçada pela observação do aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  citosólico em células endoteliais, que pode resultar em aumento da produção de NO via intensificação da atividade da NOS, aumento nos níveis do GMP cíclico e redução do  $Ca^{2+}$  intracelular em células musculares lisas com consequente vasodilatação. Curiosamente, o antioxidante N-acetilcisteína reduziu a pressão arterial, a frequência cardíaca, a concentração de catecolaminas e a expressão de receptores  $\beta$  (ambos comprometidos em ratos espontaneamente hipertensos) de maneira similar a MEL. Além disso, a queda na pressão arterial e a melhora do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos estão relacionadas com a melhora da capacidade antioxidante induzida pela administração da MEL em longo prazo, sugerindo uma associação das propriedades antioxidantes da MEL com sua capacidade em diminuir o tônus simpático (SIMKO et al., 2009).

De fato, a redução do estresse oxidativo induzida pela MEL, como veremos adiante, pode ter contribuído para a redução tanto da frequência cardíaca quanto da pressão arterial.

Na **figura 3** encontram-se os valores do peso relativo do coração dos grupos experimentais.



**Figura 3** – Peso Relativo (g/100g de peso corpóreo) do coração dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de período experimental. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

Nossos resultados mostraram que o esteróide anabólico estanozolol, quando associado ao exercício físico (grupos TE e TEM), aumentou o peso relativo do coração devido, provavelmente, a ação remodeladora proporcionada tanto pelo aumento da pressão arterial, como visto anteriormente, como por processos oxidativos induzidos pelo EST, como veremos posteriormente.

Esse resultado é corroborado por Du Toit et al. (2005), os quais observaram aumento da massa cardíaca em ratos tratados com EAA. Outros estudos (BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005; MARAVELIAS et. al, 2005; PAYNE, KOTWINSKI & MONTGOMERY, 2004) mostraram também, que esteróides anabólicos afetam os cardiomiócitos podendo levar à hipertrofia cardíaca. Além disso, o uso de anabolizantes tem sido relacionado a alterações, algumas vezes, irreversíveis do miocárdio, como a hipertrofia ventricular esquerda concêntrica (URHAUSEN et al., 2004), uma vez que, o músculo cardíaco assim

como as principais artérias, possuem grande quantidade de receptores androgênicos (BEUTEL, BERGAMASCHI & CAMPOS, 2005).

Outro fator de grande relevância no aumento peso relativo do coração é o conteúdo de fibras colágeno. Tanto o EST quanto o próprio exercício estimulam a síntese de colágeno no músculo cardíaco e a associação desses dois fatores aumenta de forma significativa o conteúdo de colágeno no coração. O EAA por si só ou em associação com o treinamento pode levar à hipertrofia cardíaca concêntrica patológica, com prejuízo da função cardíaca. O EST parece estimular a síntese de colágeno através, em grande parte, da ação da TGF-  $\beta$ 1 (*transforming growth factor-  $\beta$ 1*), um potente estimulador da síntese de colágeno, normalmente secretado na fase aguda da inflamação, que atua no reparo da área lesionada (FALANGA et al., 1998; TANNO, 2007; DROBNIK et al., 2008).

Em nosso estudo, o aumento do peso relativo do coração só ocorreu significativamente nos ratos tratados com anabolizantes e submetidos ao protocolo de treinamento. Isso sugere que esse aumento só ocorreu devido à presença de um ambiente celular propício ao remodelamento cardíaco induzido pelo EST e um estímulo adequado (treinamento). O efeito anabólico dos EAA é primeiramente mediado pelos receptores androgênicos no músculo cardíaco e esquelético. Os receptores androgênicos regulam a transcrição de genes alvo que podem controlar o acúmulo de DNA necessário para o crescimento muscular. A exposição prolongada aos EAA e o treinamento de força podem aumentar o número de receptores androgênicos. Esse seria um possível mecanismo pelo qual doses suprafisiológicas de EAA combinadas ao exercício poderiam completar uma a outra, levando à hipertrofia cardíaca (PAYNE, KOTWINSKI & MONTGOMERY, 2004).

Por outro lado, o tratamento com MEL não preveniu o aumento da massa cardíaca nos animais treinados que receberam o esteróide anabólico (grupo TEM). Nossos resultados são corroborados por Simko et al. (2009), os quais também observaram que a MEL não reverteu a hipertrofia ventricular esquerda em ratos hipertensos, porém, reduziu a fibrose no ventrículo hipertrofiado, devido ao seu efeito antioxidante. De fato, a disponibilidade de óxido nítrico e radicais livres pode

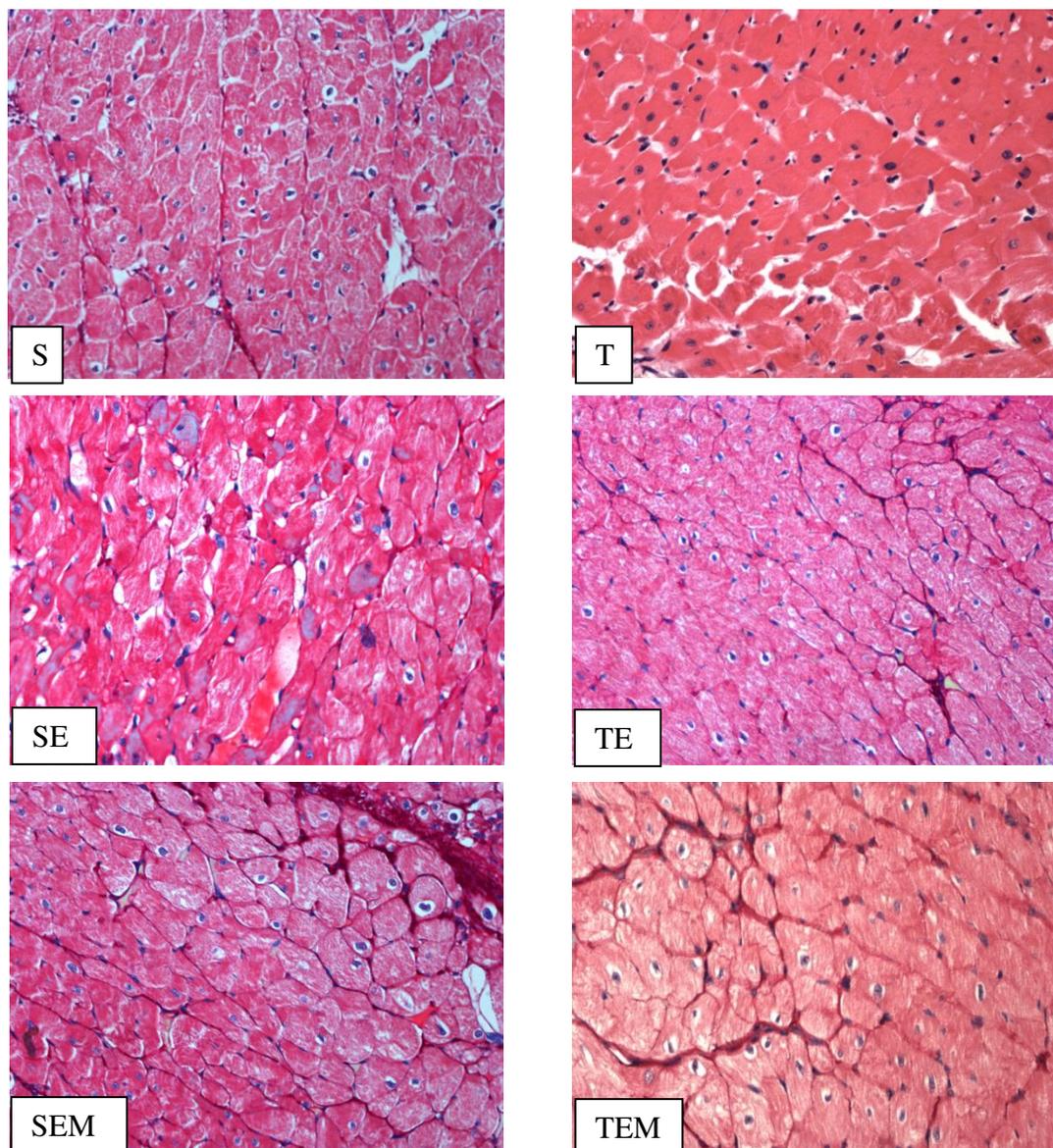
estar envolvida no remodelamento cardíaco (PAULIS & SIMKO, 2007). Além disso, a redução da pressão arterial provocada pela MEL no grupo TEM não foi suficiente para prevenir o remodelamento cardíaco nesses animais.

Outros estudos realizados em ratos demonstraram que a pinealectomia aumentou o peso do coração e a fibrose cardíaca. Pinealectomia também está associada a diversas alterações metabólicas incluindo aumento da lipólise induzida pela isoprenalina (substância simpatomimética) em ratos (PAULIS & SIMKO, 2007). Entretanto, Drobnik et al. (2008) observaram resultado oposto em seu estudo onde a pinealectomia causou redução no conteúdo de fibras colágeno no coração.

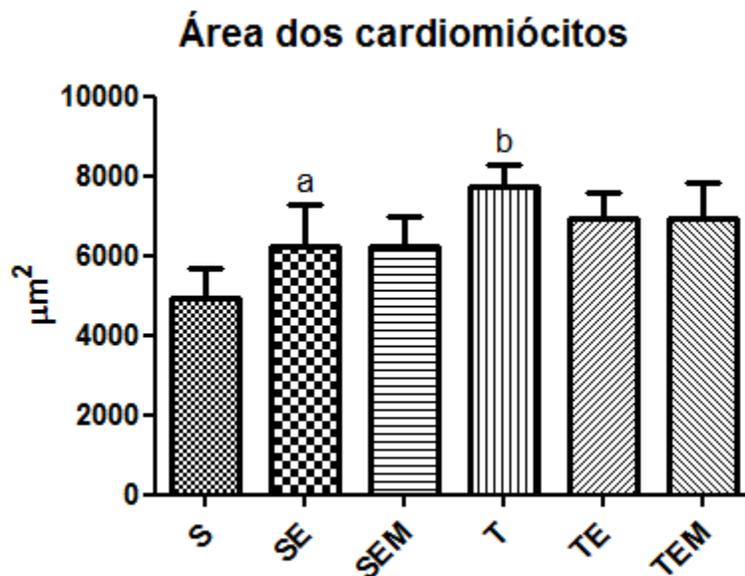
Dessa forma, novos estudos se fazem necessários para que possamos avaliar se o aumento do peso relativo cardíaco observado comprometeu aspectos hemodinâmicos da função cardíaca, especialmente aquelas pertinentes ao ventrículo esquerdo.

Para verificarmos se o aumento do peso relativo do coração foi decorrente de processo hipertrófico, determinamos a área dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo pela análise histológica de fragmentos dessa câmara cardíaca.

As **figuras 4 e 5** apresentam, respectivamente, os cortes histológicos e a área dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais.



**Figura 4** – Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo esquerdo dos ratos dos grupos sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM), corados com H-E, com aumento de 40x, após serem submetidos ao protocolo de treinamento e/ou tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Observam-se núcleos íntegros, dispostos periféricamente e ausência de processos inflamatórios, características de tecido cardíaco normal.



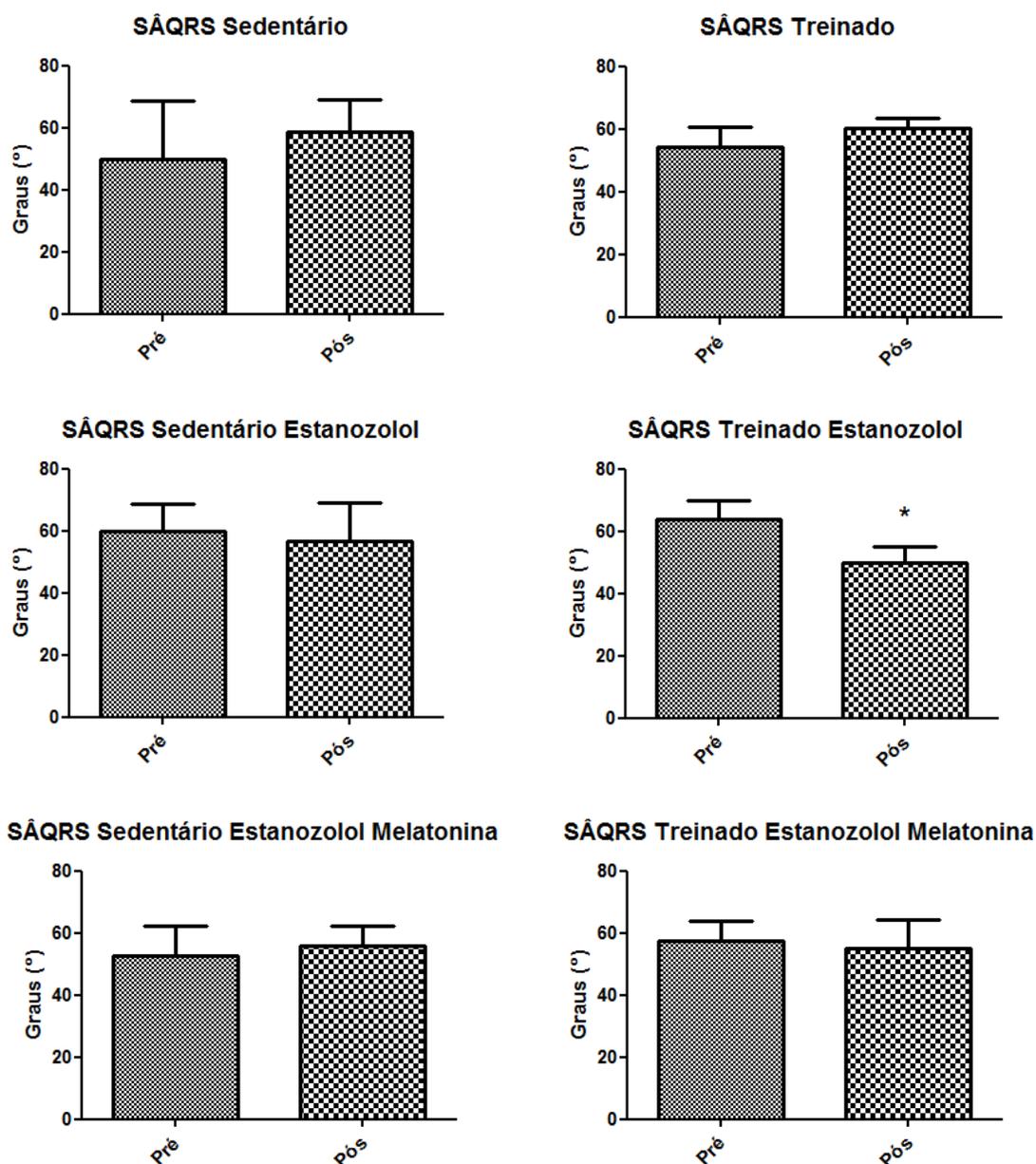
**Figura 5** – Área dos cardiomiócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

Observam-se núcleos íntegros, dispostos periféricamente e ausência de processos inflamatórios, características de tecido cardíaco normal.

Verificou-se, ainda, aumento estatisticamente significativo na área dos cardiomiócitos treinados, tratados ou não com EST (grupos SE, SEM, T, TE e TEM), caracterizando um quadro de hipertrofia ventricular esquerda.

Por outro lado, a MEL não reduziu a hipertrofia observada no grupo sedentário (grupo SEM em relação ao grupo SE) conforme anteriormente discutido.

As **figuras 6, 7 e 8** apresentam os resultados dos parâmetros cardiovasculares dos grupos experimentais, antes e após o período de treinamento e administração do EST e da MEL.



**Figura 6** – Eixo elétrico cardíaco - SÂQRS (°) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) antes e após serem submetidos ao protocolo de treinamento e ao tratamento com EST e MEL. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; \* $p < 0,05$  comparados com valores pré-treinamento. Obtidos através de Teste t,  $n=5$ .

Com relação ao eixo elétrico cardíaco (SÂQRS), verificou-se desvio do eixo para esquerda nos animais treinados e tratados com EST (grupo TE) ao final do período experimental. Os animais tratados com a MEL, não apresentaram tal desvio.

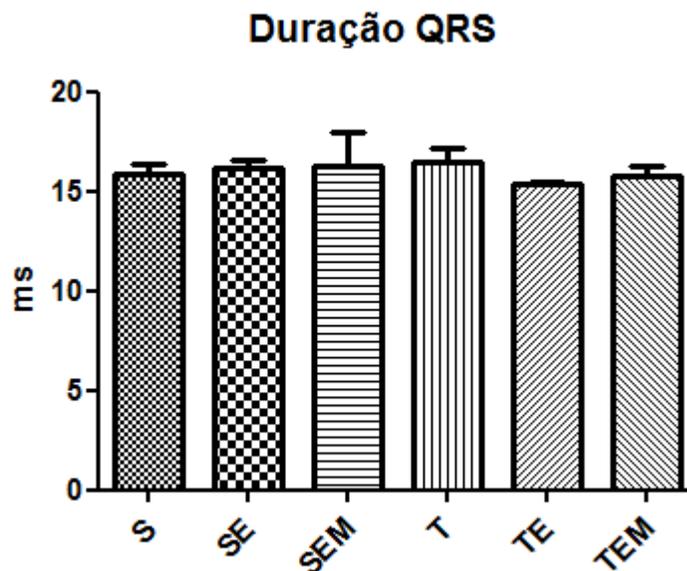
O eixo elétrico cardíaco representa a resultante das direções e magnitudes dos impulsos elétricos gerados no coração durante o ciclo cardíaco. Ele é representado por um sistema hexaxial de referência, que é dividido em quatro quadrantes para definir o eixo elétrico normal e seus desvios. Existem diferenças na divisão desses quadrantes entre os autores, alguns dividem a circunferência em quatro quadrantes iguais, porém, devido à faixa de normalidade do eixo ser bastante grande, por sofrer influência de muitas variáveis (idade, sexo, obesidade, etc.), alguns autores utilizam um limite mais amplo para o quadrante que representa o eixo elétrico normal na maioria das pessoas (KUHN & ROSE, 2008).

O eixo elétrico QRS é útil, pois auxilia a determinar a posição do coração dentro da caixa torácica, o sentido resultante do impulso elétrico cardíaco e a integridade do músculo cardíaco. Ele, por si só, não representa diagnóstico, mas auxilia no mesmo.

Apesar de algumas críticas, vários estudos sugerem que a análise do eixo elétrico QRS e seus aspectos morfológicos (alterações na amplitude ou duração), através do ECG, ainda é uma das ferramentas mais utilizada para a detecção de hipertrofia ventricular e risco de morte súbita (BACHAROVA et al., 2009a; BACHAROVA & ESTES, 2009b, ESTES & JACKSON, 2009).

O EST promoveu desvio do eixo elétrico para esquerda no grupo TE, porém dentro da faixa de normalidade prevista para a espécie estudada. Tal fato pode ter sido consequente ao aumento do peso relativo do coração e da área dos cardiomiócitos, como visto anteriormente. A MEL impediu esse desvio do eixo elétrico para esquerda devido, provavelmente, à diminuição do peso relativo do coração no grupo TEM em relação ao TE, embora não significativo.

A **figura 7** apresenta os resultados da duração do complexo QRS dos grupos experimentais.



**Figura 7** – Duração do Intervalo QRS (ms) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtido através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

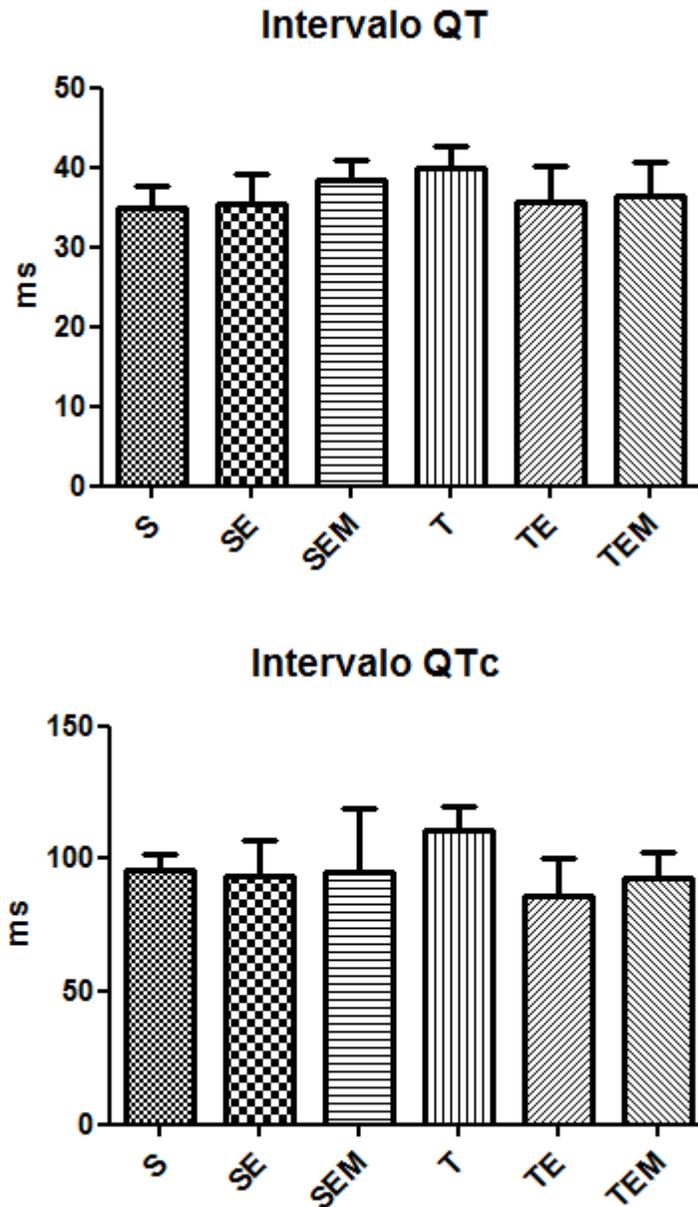
As principais alterações eletrocardiográficas associadas à hipertrofia ventricular esquerda são: aumento da duração e/ou amplitude do intervalo QRS, desvios do eixo elétrico cardíaco (SÂQRS), anormalidades do segmento ST, da onda T e P. A duração do segmento QRS encontra-se frequentemente prolongada em caso de hipertrofia ventricular esquerda. Esse prolongamento pode ser atribuído ao aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo e da fibrose intramural, que distorce e prolonga a propagação do impulso elétrico cardíaco (HANCOCK et al., 2009).

Com relação à duração do complexo QRS, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais. Assim, a ativação ventricular, caracterizada pela despolarização do septo (onda Q), do ápice (onda R) e da base

(onda S) não sofreu alterações pelos tratamentos aos quais os ratos foram submetidos.

Além disso, a hipertrofia ventricular esquerda observada no grupo TE não foi suficiente para causar um prolongamento na duração do complexo QRS, não havendo, portanto, prejuízo na condução do impulso elétrico pelos ventrículos dos animais dos grupos experimentais.

A **figura 8** apresenta os valores do intervalo QT e QTc dos ratos dos grupos experimentais.



**Figura 8** – Duração do Intervalo QT e QTc (ms) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtido através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

Em nosso estudo os intervalos QT e QTc não apresentaram diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que o EST não promoveu o prolongamento desses intervalos e, conseqüentemente, não promoveu risco de morte súbita.

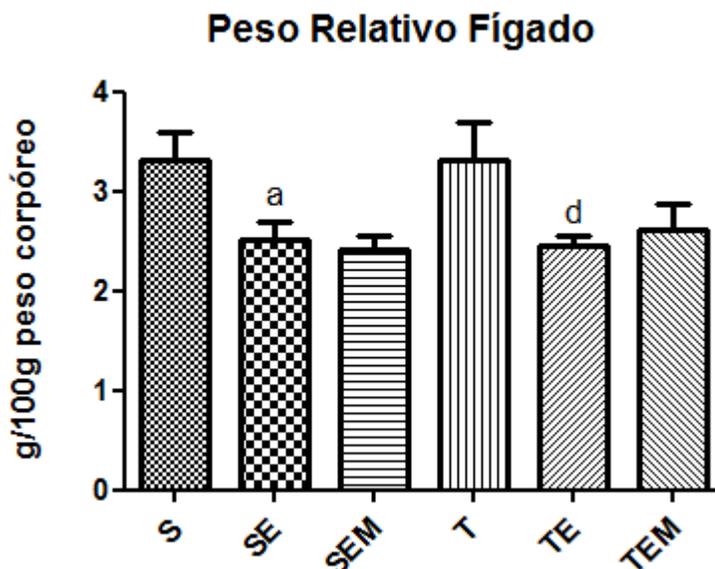
O intervalo QT compreende o período de tempo que o coração leva para completar a despolarização e a repolarização dos ventrículos e é medido, no ECG, a partir do início da onda Q até o final da onda T. O prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma é um indicativo de risco de arritmias em potencial e risco de morte súbita (BRONZATTO, SILVA & STEIN, 2001). A indústria farmacêutica e agências reguladoras utilizam o intervalo QT como medida de segurança de novas drogas. A correção desse intervalo pela frequência cardíaca ou o intervalo RR (o inverso da frequência cardíaca) se faz necessária devido ao encurtamento do intervalo QT durante a queda fisiológica do intervalo RR (LI et al., 2004). Vários grupos propuseram fórmulas para corrigir essa relação entre o intervalo QT e RR. A essa correção dá-se o nome de intervalo QTc (“c” significa “corrigido”) e tem o objetivo de eliminar a variável frequência cardíaca, que pode atrapalhar o diagnóstico do ECG. O método mais utilizado entre os médicos, por ser prática e conveniente, é a fórmula de Bazett (VIEWEG, 2003).

Vários estudos sugerem existir relação entre o uso de esteróides anabolizantes, hipertensão arterial, doença cardíaca isquêmica, hipertrofia cardíaca e risco de morte súbita (SULLIVAN, MARTINEZ & GALLAGHER, 1999; KIERZKOWSKA et al., 2005; FINESCHI et al., 2007; AHLGRIM & GUGLIN, 2009; BISPO et al., 2009).

Nossos resultados não confirmaram tal relação. A existência dessa relação é, sem dúvida, protocolo dependente. Desse modo, a duração do nosso estudo, a intensidade e volume do protocolo de treinamento proposto, além da quantidade de anabolizante administrada, influenciaram de sobremaneira os resultados obtidos, com relação a esses parâmetros.

Assim, o fato da duração dos intervalos QT e QTc terem se apresentado sem alterações entre os grupos estudados corrobora os valores de QRS encontrados, descartando risco de morte súbita (em nossas condições experimentais) sugerido nos estudos anteriormente citados em consequência do uso crônico de EAA.

Os dados referentes ao peso relativo do fígado dos grupos experimentais encontram-se na **figura 9**.



**Figura 9** – Peso Relativo (g/100g de peso corpóreo) do fígado dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após seis semanas de treinamento e/ou tratamento com EST e MEL. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

Com relação ao fígado, os animais que receberam a dose do anabolizante estanozolol, associado ou não ao treinamento de natação (grupos SE, SEM, TE e TEM), tiveram diminuição no peso relativo do fígado.

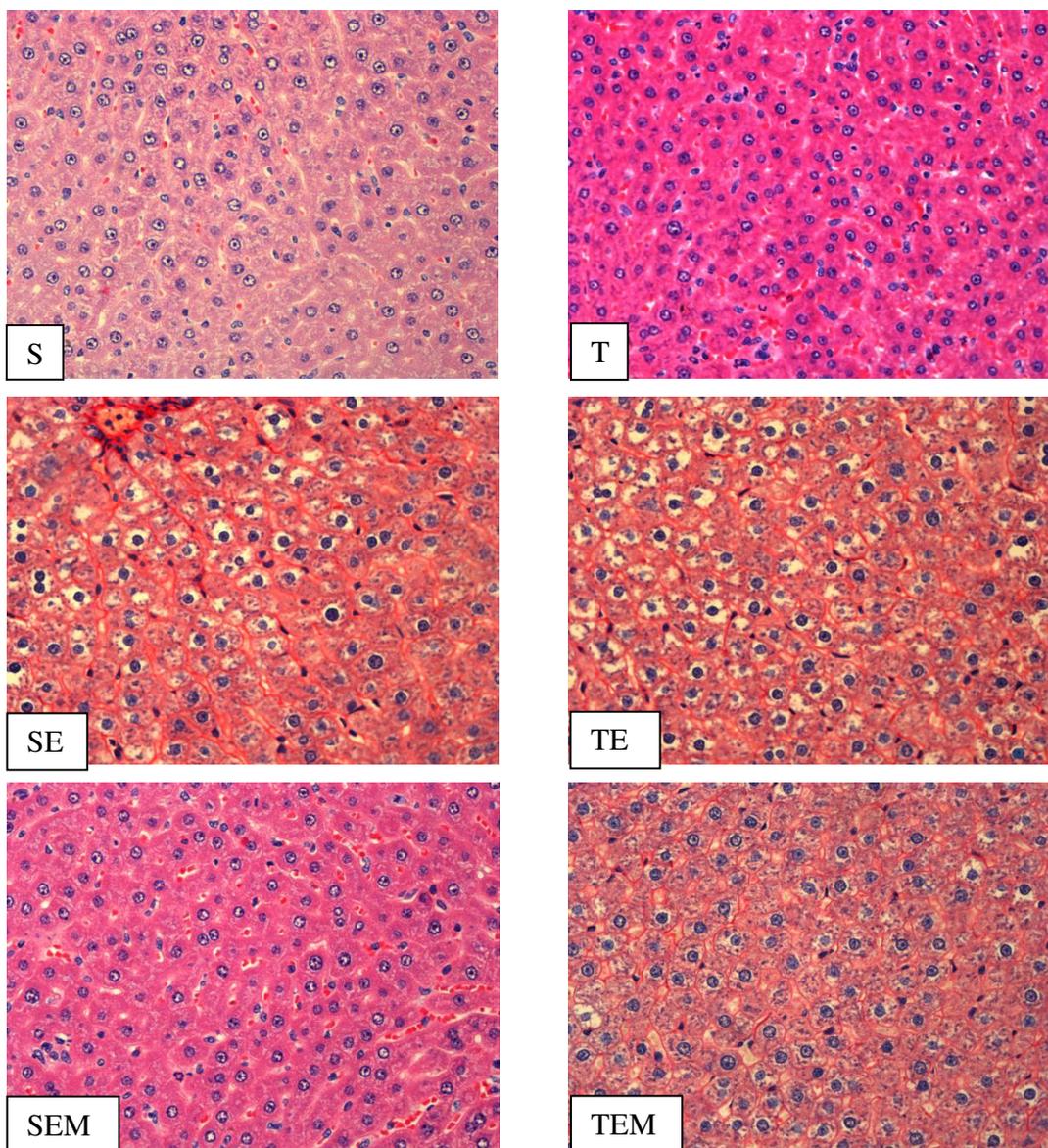
O principal efeito colateral de substâncias 17- $\alpha$ -alquiladas (como o estanozolol) é a hepatotoxicidade, incluindo elevação no nível de enzimas hepáticas, icterícia, “peliosis hepatis” (cistos contendo sangue), e várias lesões neoplásicas (WELDER; ROBERTSON; MELCHERT, 1995).

Nossos resultados concordam com os resultados apresentados por Pey et al. (2003), que mostraram queda no peso relativo do fígado nos ratos treinados e tratados com EST. Entretanto em nosso estudo, a administração do EST, por si só, causou redução no peso relativo do fígado, sendo que o treinamento não alterou esse parâmetro. Vieira, et al. (2008), também mostraram redução no peso

relativo do fígado de ratos tratados com altas doses de Decanoato de Nandrolona ( $10,3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{semana}^{-1}$ ) durante cinco semanas.

A redução no peso relativo do fígado dos ratos tratados com EST pode ter ocorrido por alterações na estrutura dos hepatócitos e/ou morte celular dos mesmos, ou até mesmo por aumento da deposição de colágeno no parênquima hepático, como observado por Vieira et al. (2008).

A **figura 10** apresenta os cortes histológicos do fígado dos ratos dos grupos experimentais.



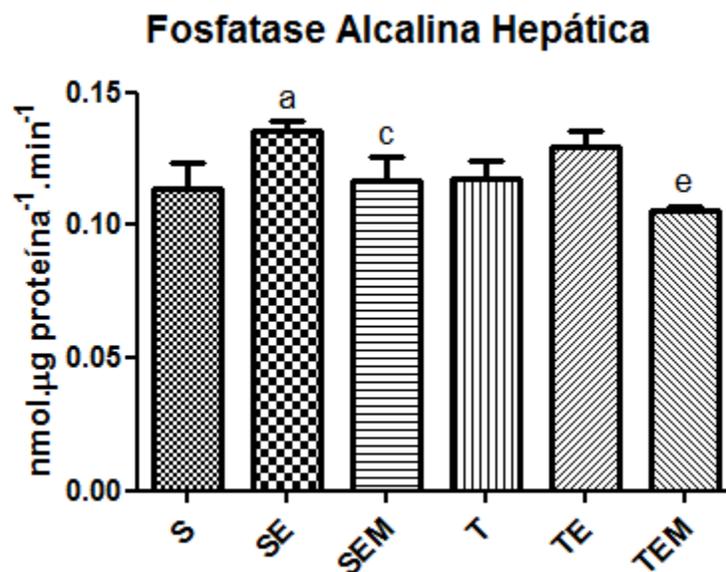
**Figura 10** – Fotomicrografia de corte transversal do fígado dos ratos dos grupos sedentário (S), Sedentário+Estanzolol (SE), Sedentário+Estanzolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanzolol (TE) e Treinado+Estanzolol+Melatonina (TEM), corados com H-E, com aumento de 40x, após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Observam-se, hepatócitos aumentados com núcleos deslocados para a periferia e alterações citoplasmáticas sugestivas de inclusão lipídica, granações nucleares indicativas de picnose nos grupos SE, TE e em menor magnitude nos grupos SEM e TEM.

Nossos resultados histológicos estão de acordo com os valores do menor peso relativo hepático nos animais dos grupos tratados com EST (grupos SE, SEM, TE e TEM), uma vez que esses grupos apresentaram hepatócitos aumentados com núcleos deslocados para a periferia provavelmente devido à inclusão lipídica no citoplasma. Além disso, foram observados hepatócitos com granulações nucleares sugestivas de picnose (estado do núcleo da célula em degenerescência).

Esses resultados são corroborados por Pey et al. (2003), Urhausen, Torsten & Wilfried (2003) e Martin, Abu Dayyeh & Chung (2008) os quais também observaram inflamação e lesões degenerativas em hepatócitos, lisossomos e mitocôndrias, além de alterações ultraestruturais em canalículos biliares decorrentes da administração do EST e outros EAA. Esses autores alertam que muitas dessas lesões ocorrem sem modificar os indicadores plasmáticos clássicos de função hepática, em estágio inicial.

O tratamento com MEL parece ter atenuado as alterações hepáticas induzidas pelo EST, uma vez que tais alterações estiveram presentes nos grupos SEM e TEM, porém, em menor magnitude.

Para avaliarmos se tais alterações estruturais comprometeram a função hepática, determinamos a atividade da enzima fosfatase alcalina no fígado (**figura 11**).



**Figura 11** – Atividade da enzima Fosfatase Alcalina hepática (nmol.µg de proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média ± desvio padrão;  $p < 0,05$  para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidos através de ANOVA seguido do teste de Tukey,  $n=5$ .

Fosfatase Alcalina hepática (FA) é uma enzima que transporta metabólitos através de membranas celulares. Doenças ósseas e hepáticas são as causas mais comuns da elevação dos níveis dessa enzima, embora ela possa ser originada de outros órgãos, como a placenta, rins, intestinos ou ainda, de leucócitos.

No fígado, ela está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos (ductos) biliares. A colestase hepática (obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos) aumenta a síntese e a liberação da FA, acumulando os sais biliares e aumentando sua liberação da superfície celular.

A lesão hepática induzida por drogas traz aumento da FA ou uma razão ALT/FA < 2 (alanina aminotransferase), embora o nível de alteração da FA seja variável e possa ser acompanhado de uma hiperbilirrubinemia. Drogas comumente usadas, como anti-hipertensivos (por exemplo, inibidores da enzima conversora de angiotensina) ou hormônios (por exemplo, testosterona ou estrogênio) podem causar colestase hepática que pode ser ignorada, já que o ultrassom é muitas vezes normal. Níveis anormais de FA também podem ser um sinal de câncer hepático, linfoma ou doenças inflamatórias como a sarcoidose. Em algumas dessas situações, o nível da FA, pode estar significativamente elevado, sendo ainda, o único sinal de envolvimento hepático. Nesses casos, o ultrassom e/ou uma biópsia hepática podem ser necessários para confirmação do diagnóstico (GIANNINI, TESTA & SAVARINO, 2005).

A figura 11 apresenta os valores da fosfatase alcalina hepática dos grupos experimentais. Observou-se que o exercício físico não alterou a atividade da enzima fosfatase alcalina em nosso estudo, resultado este, que é corroborado por Pey et al. (2003). Entretanto, esse mesmo estudo se contrapõe ao nosso ao não apresentar alterações na atividade da fosfatase alcalina após a administração de EST. Nossos resultados também estão de acordo com Vieira et al. (2008), os quais verificaram, em ratos, aumento no nível da FA após administração de Decanoato de Nandrolona ( $5,3 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{semana}^{-1}$ ) durante cinco semanas.

Yoshida et al. (1994), relataram também, um estudo de caso onde um fisiculturista apresentou aumento da enzima fosfatase alcalina hepática, três vezes acima do limite superior dos valores de referência, após apenas 4 semanas de uso de EST (125mg, 2 vezes por semana). Foram necessários 5 meses para que essa enzima voltasse aos valores normais de referência.

Em outro estudo de caso mais recente, Martin, Dayyeh & Chung (2008) relataram que um indivíduo de 27 anos, com histórico de cinco anos de uso de EAA (androstenediona oral e nandrolona intramuscular), apresentou valor de fosfatase alcalina bem acima dos valores de referência. Esse indivíduo também apresentou peliosis hepática, que evoluiu para uma hemorragia, sendo necessário que ele fosse submetido à cirurgia e transfusão sanguínea.

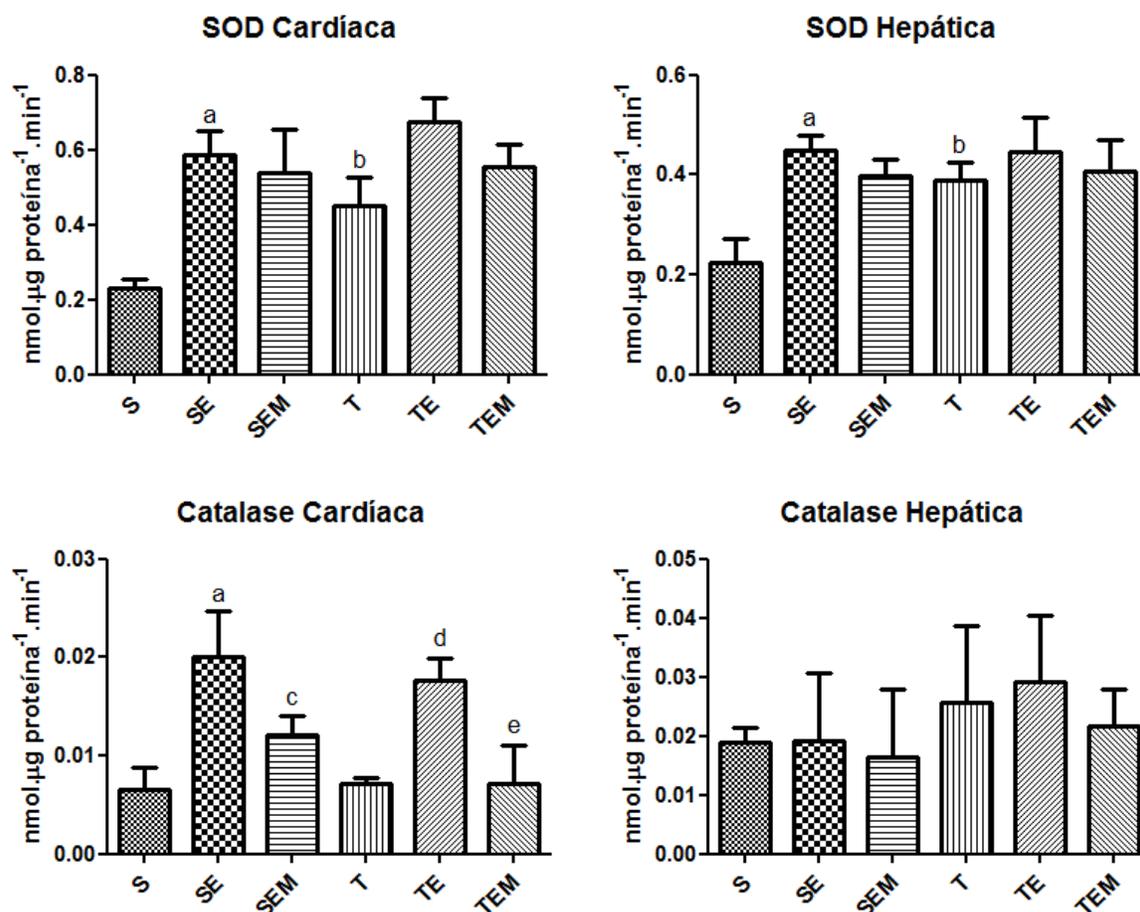
Com relação a MEL, nossos resultados estão de acordo com vários estudos que mostraram efeito protetor da MEL sobre o fígado contra o dano oxidativo produzido por agentes tóxicos (OHTA et al., 2000a,b), como é o caso do EST (por ser uma substância 17- $\alpha$ -alquilada). Em nosso experimento, a MEL preveniu os danos hepáticos induzidos pelo EST, diminuindo a atividade da FA aos valores próximos aos do grupo controle, reiterando o quadro histológico anteriormente descrito.

Montilla et al. (2001), também observaram que a MEL se mostrou mais eficiente na proteção contra os danos causados pela colestase hepática (que pode ser causada pelo uso de EAA) do que a vitamina E, diminuindo o nível da FA além de biomarcadores de estresse oxidativo.

Além disso, em um estudo onde ratos eram submetidos a tratamento com tetracloreto de carbono (um xenobiótico que produz hepatotoxicidade em humanos e animais) verificou-se que a administração de MEL atenuou significativamente o aumento da FA quando comparados a ratos que não receberam a MEL (KUS et al., 2005).

Assim, acreditamos que a ação antioxidante da MEL, como veremos a seguir, possa ter contribuído significativamente para reduzir os efeitos tóxicos ao fígado causado pela administração do EST.

A **figura 12** apresenta os valores da atividade da SOD e da CAT, no coração e no fígado, dos grupos experimentais após o período de treinamento e administração do EST e da MEL.



**Figura 12** – Atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase cardíacas e hepáticas (nmol.µg de proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos ratos dos grupos Sedentário (S), Sedentário+Estanozolol (SE), Sedentário+Estanozolol+Melatonina (SEM), Treinado (T), Treinado+Estanozolol (TE) e Treinado+Estanozolol+Melatonina (TEM) após serem submetidos ao protocolo de treinamento e tratamento com EST e MEL durante seis semanas. Resultados expressos como média ± desvio padrão; p<0,05 para (a) S x SE; (b) S x T; (c) SE x SEM; (d) T x TE; (e) TE x TEM. Obtidas através de ANOVA seguido do teste de Tukey, n=5.

Uma estratégia para se determinar os efeitos o exercício físico agudo ou crônico sobre o estresse oxidativo é mensurar a atividade das enzimas antioxidantes. A modificação das defesas antioxidantes pode refletir uma menor

ou maior taxa de produção de espécies reativas de oxigênio durante o exercício, já que as células podem ativar a síntese de enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo (MORÁN et al., 2004).

Diversos estudos têm avaliado a influência do treinamento físico sobre a atividade de enzimas antioxidantes específicas. Alterações nas atividades dessas enzimas em resposta ao treinamento de *endurance* não são muito consistentes na literatura científica (GUL et al., 2006). Resultados controversos com biomarcadores de estresse oxidativo e de sistemas antioxidantes em resposta ao treinamento físico, frequentemente relatados na literatura, devem ocorrer devido aos diferentes modelos empregados (baixa vs. alta intensidade de treino, corrida vs. natação, macho vs. fêmea, rato vs. camundongo, etc.) além de diferentes parâmetros de estresse oxidativo e de metodologias utilizadas para as determinações desses parâmetros (ATALAY & SEN, 1999).

Esses resultados conflitantes refletem a dificuldade técnica em se detectar espécies de radicais livres, que podem, rapidamente, ser convertidas em outros EROs por uma reação em cadeia de radicais livres e/ou interagir com antioxidantes intracelulares (JI, 2000).

O coração possui as 3 principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) em grande quantidade, assim como níveis adequados de GRD e GST. O exercício físico regular pode influenciar positivamente as defesas antioxidantes cardíacas e promover melhoria da função cardíaca. Entretanto, o exercício crônico possui dois efeitos: por um lado, resulta em maior formação de radicais livres, podendo levar a um estado de estresse oxidativo. Por outro lado, talvez como consequência, pode aumentar a atividades das enzimas antioxidantes, minimizando os efeitos do estresse oxidativo (GUL et al. 2006).

Já está bem estabelecido que existe uma relação entre treinamento físico e estresse oxidativo. Vários autores sugerem que o exercício induz adaptações em vários tecidos contra o dano oxidativo, devido principalmente a um estresse oxidativo moderado, que levaria à *up regulation* na expressão do gene de enzimas antioxidantes (CHAVES et al., 2006).

Em nosso experimento, tanto o treinamento físico quanto a administração do EST promoveram aumento da atividade da SOD cardíaca e hepática. A MEL reduziu, embora não significativamente os efeitos do EST sobre a atividade da SOD.

Nossos resultados são corroborados por estudos que mostraram que a atividade física regular promove aumento da atividade da SOD muscular esquelética e cardíaca (ATALAY & SEN, 1999; CHAVES et al., 2006; MORÁN et al., 2004; GUNDUZ et al., 2004; ASCENSÃO, et al., 2003; LEEUWENBURGH & HEINECKE, 2001).

Um estudo feito por Qiao, Hou & Lui (2006) também encontrou aumento da atividade da SOD nos músculos cardíacos e esqueléticos após protocolo de treinamento anaeróbio intermitente de natação de apenas 6 dias.

Por outro lado, em um estudo feito com ratos por Rabbo-Souza et al. (2004), o treinamento de corrida em esteira cinco vezes por semana, por treze semanas, resultou em queda na atividade da SOD cardíaca.

Segundo Berra & Rizzo (2009) a MEL aumenta a atividade da enzima SOD. Isso não ocorreu em nossos resultados. Este fato pode ser explicado, pois em nosso estudo, os ratos que foram tratados com MEL receberam, invariavelmente, o tratamento com EST, fazendo com que estes ratos já tivessem uma elevação na atividade da SOD. Além disso, a MEL atua também como agente antioxidante direto, o que poderia levar a uma diminuição das EROs e conseqüentemente a manutenção ou até mesmo diminuição da atividade da SOD.

Nossos resultados da atividade da SOD hepática estão de acordo com os resultados apresentados por Pey et al. (2003). Nesse estudo também houve aumento da atividade da SOD hepática nos ratos que receberam as injeções de EST. Por outro lado, nesse mesmo estudo, o treinamento não levou ao aumento da SOD hepática, como visto em nosso experimento.

Com relação à atividade da CAT cardíaca, o EST causou aumento na atividade desta enzima, aumento este, revertido pela administração da MEL, trazendo a atividade dessa enzima para valores próximos dos valores do grupo controle. O treinamento não promoveu alteração na atividade da CAT cardíaca.

Contraopondo nosso resultado, em um estudo feito por Chaves et al. (2006), não houve diferença significativa na atividade da CAT cardíaca entre ratos tratados com o EAA decanato de nandrolona e ratos controle.

Os resultados existentes na literatura sobre como a atividade da CAT é afetada pelo exercício físico são especialmente contraditórios. Alguns estudos mostram aumento da atividade da CAT após o exercício físico. (JI, 2000; GUNDUZ et al., 2004). Outros estudos, não apresentam alteração na CAT após o exercício (CHAVES et al., 2006; MORTON et al., 2006; KHASSAF et al., 2001). Existem ainda estudos mostrando queda na atividade da CAT após o exercício físico (PRADA et al., 2004; MÓRAN et al., 2004).

A intensidade do exercício parece ser um fator chave na detecção dos efeitos das EROs nas enzimas antioxidantes dos corações de ratos (JI, 2000). Outro fator que nos parece importante é o momento em que a análise da atividade das enzimas antioxidantes é realizada, após a última sessão de exercício físico.

Quanto a MEL, a maioria dos estudos mostra aumento da atividade da CAT após tratamento com MEL. Em nosso estudo, obtivemos resultado parecido com o resultado da SOD (porém com significância estatística): houve queda significativa da atividade da CAT após tratamento com MEL, quando comparado com o grupo TE.

Acreditamos que o aumento das enzimas antioxidantes induzido pela MEL não ocorra em um ambiente onde o estresse oxidativo (e as adaptações induzidas por ele) já esteja instalado. Assim, o efeito antioxidante direto exercido pela MEL levaria à diminuição do estresse oxidativo e, por consequência, da atividade das enzimas antioxidantes.

Já em relação à CAT hepática, embora nossos resultados não tenham atingido significância estatística, a diferença entre os grupos foi substancial. Observamos um comportamento do gráfico muito semelhante ao ocorrido com a CAT cardíaca, porém a magnitude dos desvios-padrão de nossas amostras impediu que fossem encontradas diferenças estatisticamente significativas.

## 5. Conclusões

Após análise dos resultados, observamos que:

1. O EST associado ao treinamento (grupo TE) aumentou a pressão arterial sistólica e diastólica, aumento este, revertido pela administração de MEL (grupo TEM).
2. O EST aumentou o peso relativo do coração, quando associado ao exercício físico (grupo TE). O tratamento com MEL não preveniu esse aumento (grupo TEM). O EST diminuiu o peso relativo do fígado (grupos SE, SEM, TE e TEM). O tratamento com MEL também não preveniu essa diminuição.
3. O EST quando associado ao treinamento (grupo TE) desviou o eixo elétrico cardíaco para esquerda. O tratamento com MEL impediu a ocorrência desse desvio. Não houve diferença significativa nos parâmetros eletrocardiográficos entre os grupos experimentais, sugerindo que o EST não aumentou o risco de morte súbita.
4. O EST causou aumento dos hepatócitos e deslocamento dos núcleos para a periferia provavelmente devido à inclusão lipídica no citoplasma. O tratamento com MEL parece ter atenuado as alterações hepáticas induzidas pelo EST.
5. A administração de EST levou ao aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina. A MEL mostrou possuir efeito protetor sobre o fígado contra o dano oxidativo produzido pelo EST. A administração do EST promoveu aumento da atividade da SOD cardíaca e hepática, quadro este, não revertido pela MEL. O EST causou aumento na atividade da CAT cardíaca, o qual foi revertido pela administração da MEL.

Assim, concluímos que, em nossas condições experimentais, a melatonina atenuou os efeitos adversos ao sistema cardiovascular e ao fígado causados pelo uso de doses suprafisiológicas de estanozolol.

## 6. Referências Bibliográficas

ACIKEL, M. et al. Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. **J Pineal Res.** 35:75-79, 2003.

AHLGRIM C; GUGLIN M. Anabolics and cardiomyopathy in a bodybuilder: case report and literature review. **J Card Fail.** 15(6):496-500, 2009.

AMORY, J.K.; BREMNER, W.J. Newer agents for hormonal contraception in the male. **Trends Endocrinol. Metab.** 11: 61-66, 2000.

ANISIMOV, V. N. Effects of Exogenous Melatonin—A Review. **Toxicol. Pathol.** 31:589–603, 2003.

ASCENSÃO, A., et al. Exercício e *Stress* Oxidativo Cardíaco. **Rev Port Cardiol.** 22(5):651-678, 2003.

ASCENSÃO, A.; FERREIRA, R.; MAGALHÃES, J. Exercise-induced cardioprotection – biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. **Int J Cardiol.** 117: 16-30, 2007.

ATALAY, M.; SEM, C.K. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. **Ann N Y Acad Sci.** 874:169-177, 1999.

AZEVEDO, J.R.M. Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados durante natação intensa. **Tese de Doutorado.** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 1994.

BACHAROVA, L. et al. Effect of changes in left ventricular anatomy and conduction velocity on the QRS voltage and morphology in left ventricular hypertrophy: a

model study. **J Electrocardiol.** xx:xxx-xxx, 2009a. (DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2009.07.014).

BACHAROVA L; ESTES E.H. Electrocardiographic diagnosis of left ventricular hypertrophy: depolarization changes. **J Electrocardiol.** 42(3):228-232, 2009b.

BARRY, A.S., et al. Elevated endogenous testosterone concentrations potentiate muscle androgen receptor responses to resistance exercise. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.** 114:195-199, 2009.

BATES, P.C.; CHEW, L.C.; MILLWARD, D.J. Effects of the anabolic steroid stanozolol on growth and protein metabolism in the rat. **J. Endocr.** 114:373-381, 1987.

BAUME, N., et al. Effect of multiple oral doses of androgenic anabolic steroids on endurance performance and serum indices of physical stress in healthy male subjects. **Eur J Appl Physiol.** 98:329-340, 2006.

BERRA, B; RIZZO, A.M., Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. **Clin Dermatol.** 27:202-209, 2009.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in males rats. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.** 93:43-48, 2005.

BISPO, M. et al. Anabolic steroid-induced cardiomyopathy underlying acute liver failure in a young bodybuilder. **World J Gastroenterol.** 15(23): 2920-2922, 2009.

BRONZATTO, H.A.; SILVA, R.P.; STEIN R. Morte súbita relacionada ao exercício. **Rev Bras Med Esporte** 7(5):163-169, 2001.

BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Semin Fetal Neonat Med.** xx: 1-9, 2007.

CHAVES, E.A., et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.** 99 (4-5):223-230, 2006.

CLARK, A.S.; BLASBERG, M.E.; BENNETT-BRANDLING, E.M. Stanozolol, Oxymetholone, and Testosterone Cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiol. Behav.** v.63 (2): 287-295, 1998.

COHEN G.; DEMBIEC D.; MARCUS J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Anal Biochem.** 34:30-8, 1970.

COSTA, E.C.S., et al. Os Efeitos da Metformina sobre a Dispersão do Intervalo QT e QTc de Ratos Diabéticos. **Arq Bras Cardiol.** 90(4): 254-260. 2008.

CUNNINGHAM, R.L.; MCGINNIS, M. Y. Factors influencing aggression toward females by male rats exposed to anabolic androgenic steroids during puberty. **Horm. Behav.** 51:135-141, 2007.

DOBSAK, P. et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. **Pathophysiology**, 9:179-187, 2003.

DOUMIT, M.E.; COOK, D.R.; MERCKEL, R.A. Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro. **Endocrinology**, 137: 1385-1394, 1996.

DROBNIK, J. et al. Regulatory influence of melatonin on collagen accumulation in the infarcted heart scar. **J Pineal Res.** 45: 285-290, 2008.

DU TOIT, E.F. et al. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion injury. **Cardiovasc J South Afr**, 16:21-28, 2005.

ESTES, E.H. JR.; JACKSON, K.P. The electrocardiogram in left ventricular hypertrophy: past and future. **J Electrocardiol**. 42(6):589-92, 2009.

ELASHOFF, J.D., et al. Effects of metabolic-androgenic steroids on muscular strength. **Ann. Inter. Med.** 115: 387-393, 1991.

EL-MAS, M. M. et al. Testosterone Facilitates the Baroreceptor Control of Reflex Bradycardia: Role of Cardiac Sympathetic and Parasympathetic Components. **J Cardiovasc Pharmacol**. 38(5):754-763, 2001.

ELOSUA, R. et al. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to a acute physical activity, in healthy young men and women. **Atherosclerosis**. 167:327-334, 2003.

EVANS, N.A., Current Concepts in Anabolic-androgenic steroids. **Am J Sports Med**. 32:534-542, 2004.

FALANGA, V., et al. Stimulation of Collagen Synthesis by the Anabolic Steroid Stanozolol. **J Invest Dermatol**. 111:1193-1197, 1998.

FINESCHI, V., et al. Anabolic Steroid Abuse and Cardiac Sudden **Death**. **Arch. Phatol. Lab. Med**. 125:253-255, 2001.

FINESCHI, V., et al. Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic findings in two fatal cases of bodybuilders. **Int J Legal Med**. 121: 48-53, 2007.

FRIEDL, K.E. Effect of anabolic steroid use on body composition and physical performance. In: Yesalis, C.C., ed. **Anabolic Steroids in Sport and Exercise**. Champaign, IL: Human Kinetics: 139-174, 2000.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**. 172(3):367-379, 2005.

GOMEZ-CABRERA, M. et al. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. **Brit J Nutr**. 96:S31-S33, 2006.

GRUBER, A.J.; POPE, H.G. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in woman. **Psychother. Psychosom.**, 69: 19-26, 2000.

GUL, M. et al. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 143:239-245, 2006.

GÜNDÜZ F., et al. The Effect of One Year's Swimming Exercise on Oxidant Stress and Antioxidant Capacity in Aged Rats. **Physiol. Res**. 53:171-176, 2004.

HANCOCK, E.W. et al. AHA/ACCF/HRS Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram: Part V: Electrocardiogram Changes Associated With Cardiac Chamber Hypertrophy. **J Am Col Cardiol**. 53(11):992–1002, 2009.

HARTGENS, F. et al. Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). **Br. J. Sports Med**. 38:253-259, 2004.

HARTGENS, F. & KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes – Review Article. **Sports Med**. 34(8):513-554, 2004.

HUSSAIN, S.A.R. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. **J. Pineal Res.** 42:267-271, 2007.

IELLAMO, F. Conversion From Vagal to Sympathetic Predominance With Strenuous Training in High-Performance World Class Athletes **Circulation.** 105:2719-2724, 2002.

JARZYNSKA, M.J. et al. Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules. **J. Pineal Res.** 41:324-336, 2006.

JI, L.L. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. **Soc Exper Biol Med.** 222:283-291, 1999.

JI, L.L. **Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise:** exercise-induced oxidative stress in the heart. Part IX – Chapter 25. Elsevier Science B. V. 689-714. 2000.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I.; POPE, H.G. JR.; Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? – Review. **Drug and alcohol depend.** 98(1-2):1-12, 2008.

KANG, J.J., et al. Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. **Am J PhysiolRenal Physiol.** 291:495–502, 2006.

KHAN, S.H., et al.; Hypertension and metabolic syndrome: Impact of clustering of hypertension in subjects with metabolic syndrome. **Pak J Med Sci.** 23(6):903-908, 2007.

KHASSAF, M. et al. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. **J Appl Physiol.** 90:1031–1035, 2001.

KHUN, C.M. Anabolic Steroids. **Recent Prog. Horm. Res.**, 57: 411–434, 2002.

KICMAN, A.T., Pharmacology of anabolic steroids – Review. **Br J Pharmacol.** 154:502-521, 2008.

KIERZKOWSKA, B., et al. Myocardial Infarction in a 17-year-old Body Builder using Clenbuterol. **Circ. J.** 69: 1144-1146, 2005.

KNEZ, W.L.; JENKINS, D.G.; COOMBES, J.S. Oxidative Stress in Half and Full Ironman Triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc.** 39:283-288, 2007.

KUHN, L.; ROSE, L. ECG Interpretation Part 1: Understanding Mean Electrical Axis. **J Emerg Nur.** 34(6):530-534, 2008.

KUS, I. et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. **Cell Biochem Funct.** 23:169–174, 2005.

LAMB, D.J.; WEGEL, N.L.; MARCELLI, M. Androgen receptors and their biology. **Vitam. Horm.** 62: 199-230, 2001

LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. **Curr Med Chem.** 8:829-838, 2001.

LISE, M.L.Z., et al. O abuso de esteróides anabólico-androgênico em atletismo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** 45 (5): 364-370, 1999.

LI, L. et al. QT analysis: a complex answer to a ‘simple’ problem. **Statist. Med.** 23:2625–2643, 2004.

LIU, J. et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol.** 89:21-28, 2000.

LUNZ, W. et al. Anabolic steroid and exercise-induced cardiac stress protein (HSP72) in the rat. **Braz J Med Biol Res.** 39:889-893, 2006.

MARAVELIAS, C., et al. Adverse effects of anabolic steroids in athletes – A constant threat. **Toxicol. Letters**, 158:167-175, 2005.

MARCUS, R.P.; JUNIOR, E.J.M.B.; FERREIRA, Z.S. Ritmos Biológicos: entendendo as horas, dias e estações do ano. **Revista Einstein.** 1:143-148, 2003.

MARQUES, M.A., et al. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Ver. Bras. Med. Esporte.** 9, nº 1. Fev., 2003.

MARTIN, N.M.; ABU DAYYEH B.K.; CHUNG R.T. Anabolic steroid abuse causing recurrent hepatic adenomas and hemorrhage. **World J Gastroenterol.** 14(28):4573-4575, 2008.

MARTINS M.J.; NEGRÃO M.R.; HIPOLITO-REIS C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clinical Biochemistry** 34(6): 463-468, 2001.

MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz J Med Biol Res.** 37(12):1909-1917, 2004.

MCGINNIS, M. Y. et al. Effects of withdraw from Anabolic Androgenic Steroids on aggression in adult male rats. **Physiol. Beh.**, 75: 541-549. Jan, 2002.

MCGINNIS, M. Y. et al. Physical Provocation Potentiates Aggression in Male Rats Receiving Anabolic Androgenic Steroids. **Hor. Beh.** 41: 101-110. Aug, 2001.

MONTILLA, P. et al. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. **J. Pineal Res.** 31:138–144, 2001.

MORÁN, M. et al. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. **Acta Physiol Scand.** 180:157-166, 2004.

MORTON, J. P., et al. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. **J Appl Physiol** 101:176–182, 2006.

NAKAO, C. et al. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J. Appl. Physiol.** 88:649-654, 2000.

OHTA, Y. et al. Protective effect of melatonin against  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate induced liver injury in rats. **J. Pineal Res.** 29:15–23, 2000a.

OHTA, Y. et al. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. **J. Pineal Res.** 28:119–126, 2000b.

O'SULLIVAN S.E.; BELL C. The effects of exercise and training on human cardiovascular reflex control. **J Auton Nerv Syst.** 81(1-3):16-24, 2000.

PANSARASA, O. et al. "Oxidative Stress": effects of mild endurance training and testosterone treatment on rat gastrocnemius muscle. **Eur J Appl Physiol.** 87:550-555, 2002.

PAULIS, L.; ŠIMKO, F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind – Minireview **Physiol. Res.** 56: 671-684, 2007.

PAYNE, J.R.; KOTWINSKI, P.J.; MONTGOMERY, H.E. cardiac effects of anabolic steroids. **Heart**, 90:473-475, 2004.

PEREIRA-JUNIOR, P.P. et al. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **Eur J Appl Physiol**. 96:487-494, 2006.

PEY, A. et al. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzymes activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J Steroid Biochem. Mol. Biol**. 87:269-277, 2003.

PINHO, R.A. et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rats skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol. Intern**. 30:848-853, 2006.

POULIOT, W.A.; HANDA, R.J.; BECK, S.G. Androgen Modulates N-Methyl-D-Aspartate-Mediated Depolarization in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. **Synapse** 23:10-19, 1996.

POWERS, S.K.; SEN, C.K. **Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise**: Physiological antioxidants and exercise training. Part IV – Chapter 10. Elsevier Science B. V., 221-242, 2000.

PRADA, F.J.A., et al. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Rev. Bras. Ci. e Mov**. 12(2): 29-34, 2004.

QIAO, D.; HOU, L.; LIU, X.; Influence of intermittent anaerobic exercise on mouse physical endurance and antioxidant components. **Br J Sports Med**. 40(3):214-218, 2006.

RABBO-SOUZA, M.P. et al. Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats. **Exp Clin Cardiol** 8(4):201-205, 2004.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem. Intern.** 49:387-392, 2006.

RAMOS, L. A. F. Efeito da Melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

REITER, R.J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans – Review. **Acta Bioch Polonica**, 50:1129-1146, 2003.

RIBEIRO FILHO, F.F. et al. Obesidade, hipertensão arterial e suas influências sobre a massa e função do ventrículo esquerdo. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 44(1):64-71, 2000.

SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M.A. Estróides anabolizantes no esporte. **Rev. Bras. Med. Esporte** – Vol. 8, nº 6 – Nov/Dez, 2002.

SIMKO, F.; PAULIS, L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. **J Pineal Res.** 42:319-322, 2007.

SIMKO, F. et al. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** 27 Suppl 6:5-10, 2009.

SINHA-HIKIM, I. et al. Androgen Receptor in Human Skeletal Muscle and Cultured Muscle Satellite Cells: Up-Regulation by Androgen Treatment. **J Clin Endocrinol Metab.** 89: 5245–5255, 2004.

SULLIVAN, M.L. et al. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Progr. Cardiovasc. Dis.**, 41: 1-15, 1998.

SULLIVAN, M. L.; MARTINEZ, C. M.; GALLAGHER, E. J. Atrial Fibrillation and Anabolic Steroids. **The J Emerg Med**, 17(5):851–857, 1999.

TAKAHASHI, M., et al. Endocrinological and Pathological effects of Anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocr. J.* 51 (4), 425-434, 2004.

TAMAKI, T., et al. Anabolic steroids increase exercise tolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 280:E973-981, 2001.

TAMURA, E.K.; SILVA, C.L.M.; MARKUS, R.P. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. **J. Pineal Res.** 41:267-274, 2006.

TANNO, A.P. **Alterações Cardíacas Induzidas por Esteróide Anabólico Androgênico em Ratos Sedentários e Treinados.** 85f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

TEIXEIRA, A. **Propriedades Antioxidantes da Melatonina:** Inibição de Enzimas Pró-Oxidantes e Ação Contra a Peroxidação Lipídica. 85f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TENGATTINI, S., et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin – Mini Review. **J. Pineal Res.** 44:16–25, 2008.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **J Pineal Res.** 39:99-104, 2005.

URHAUSEN, A. et al. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart** 90: 496-501, 2004.

URHAUSEN, A.; TORSTEN, A.; WILFRIED K. Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic–androgenic steroid abusers. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.** 84:369–375, 2003.

VIEWEG, W. V. R. New Generation Antipsychotic Drugs and QTc Interval Prolongation **J Clin Psychiatry.** 5:205–215, 2003.

VIEIRA, P.R., et al. Dose-dependente hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. **Med Sci Sports Exerc.** 40(5):842-847, 2008.

WELDER, A.A., ROBERTSON, J.W., MELCHERT, R.B. Toxic Effects os Anabolic-Androgenic Steroids in Primary Rat Hepatic Cell Cultures. **J Pharmacol Toxicol Met.** 33: 187-195, 1995.

WINTERBOURN, C.C.; HAWKINS, R.E.; BRIAN, M.; CARREL, R.W. The estimation of red cells superoxide dismutase activity. **J. Lab. Clin. Med.** 85: 337-341, 1975.

YEUNG, H.M.; HUNG, M.W.; FUNG, M.L. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats. **J Pineal Res.** Nov;45(4):373-82, 2008.

YOSHIDA, E.M. et al. At what price, glory? Severe cholestasis and acute renal failure in an athlete abusing stanozolol. **Can Med Assoc J.** 151(6): 791–793, 1994.

ZAUGG, M. et al. Anabolic Androgenic Steroids Induce Apoptotic Cell Death in Adult Rat Ventricular Myocytes. **J. Cell. Physiol.** 187: 90-95, 2001.

## 7. Anexo

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos submetidos ao exercício de natação":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( X ) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança\*:  
Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº 1649-1.

*\* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

*Gustavo*

Aluno: Gustavo Barbosa dos Santos

*Miguel*

Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Nome:  
Função:

*Profa. Dra. Anamaria A. Guaraldo*

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP