

**ELEN AGUIAR CHAVES**

**PAPEL DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NA  
CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA PELO  
EXERCÍCIO: EFEITOS DELETÉRIOS DO USO DO  
ANABOLIZANTE DECANOATO DE  
NANDROLONA**

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ visando à obtenção  
do grau de Doutor em Ciências  
(Fisiologia)**



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade do Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado em duas etapas, a primeira no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ sob orientação dos professores Dr. José Hamilton Matheus Nascimento e Dra. Masako Oya Masuda, e a segunda no Laboratório de Artrópodes e Hematófagos, sob orientação do professor Dr. Marcus Fernandes de Oliveira. Contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CHAVES, Elen Aguiar

**PAPEL DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NA CARDIOPROTEÇÃO  
INDUZIDA PELO EXERCÍCIO: EFEITOS DELETÉRIOS DO USO  
DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA**

xii, 133 fls.

Tese: Doutorado em Ciências (Fisiologia)

1. Exercício    2. Anabolizante    3. enzimas antioxidantes    4. Isquemia-reperfusão

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

II. Título

"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se em ver a vida passar;  
É melhor tentar, ainda em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final;  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder;  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver"  
(Martin Luter King)

Apesar de cientista e, portanto, sabendo do impacto das minhas palavras, dedico essa tese primeiramente a Deus e aos seres de luz que sempre me guiaram e protegeram, me permitindo chegar até aqui.

A minha família de sangue: meus pais Sueli e Celso e meu irmão Rafael, e a minha família de coração: Khalida, Carlinha, Daniel e Bárbara, pela força, incentivo e paciência que tiveram comigo nas várias passagens turbulentas de meu caminho.

Ao amor da minha vida, meu companheiro de jornada Roberto Tavares, sem o qual acho que não teria forças para levantar-me e retomar minha vida da forma que o fiz.

Aos meus verdadeiros amigos, pelo amor, respeito e auxílio nos momentos mais difíceis de minha jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus guias espirituais, pela luz e proteção, sempre colocando as pessoas certas nos momentos certos, me proporcionando os ensinamentos e a paz interior necessários para a conclusão desse trabalho.

Aos ratinhos que doaram suas matérias para que este trabalho pudesse ter sido realizado. Desejo que tenham encontrado a luz e que tenham ido para um lugar melhor pelo sacrifício que foram forçados a fazer que resultou nessa tese.

Aos meus pais e avós pelo amor, carinho, incentivo e formação que me proporcionaram desde meu nascimento e ao meu irmão pela companhia e companheirismo de todos os dias.

À minha família de coração: meus irmãos, Dani, Barbarela e Carlinha, mãe Khalida por estarem na minha vida nos momentos em que mais precisei, pelas confidências e amor fraternal incondicional.

À Masako pela oportunidade de ingressar na vida científica, por guiar e me servir de exemplo desde a iniciação científica até o presente momento, posso falar que ela foi minha mãe na pesquisa.

Ao José Hamilton por ter me acolhido como orientanda, começando um projeto novo e posteriormente, por ter respeitado-me e dado a liberdade de seguir meu caminho na pesquisa, descambando para a bioquímica.

Ao Marcus, por ser literalmente o anjo que cruzou o meu caminho nos momentos em que mais precisava de um rumo. Pelo exemplo de pesquisador brilhante, pelos ensinamentos, e pela paciência principalmente no final desta tese... Serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim.

Ao meu noivo, Roberto, por ter me auxiliado a reencontrar meu brilho e meu caminho. Pela paciência, amor e carinho que tem me ofertado: Se não fosse você, meu amado, acho que não teria terminado de escrever essa tese.

À "Deisoca" pela paciência, ensinamentos, amizade, amor e cuidado.

Ao Fernando Pompeu e à Luciane por acreditarem em mim durante a graduação e pela ajuda nos momentos iniciais da minha jornada.

Aos meus amigos e companheiros de projeto, Pedrão e Rodriguinho, pela força e pelos desabafos nos momentos difíceis deste trabalho.

À Denise Carvalho por ter acreditado nesse projeto, pela força comprando a esteira para os ratos e pelos toques no decorrer do meu doutorado.

Ao Valdo, técnico do Laboratório de Fisiologia Endócrina, pelo auxílio no sacrifício dos animais.

Ao prof Pedro Langerblad por ter me ajudado a voltar a acreditar em mim e no meu potencial na pesquisa, e que é normal à percepção de que quanto mais estudamos descobrimos que menos sabemos.

Aos meus melhores amigos: Norminha, João Pedro, Ju Batista e Ana Caroline pela paciência, compreensão e carinho, por estarem do meu lado não só nos momentos bons, como também nos ruins.

Aos amigos da velha guarda da Eletrofisiologia Cardíaca, Paty, Emerson, Fred, Fabrício e Carol por me aturarem e me darem força no início do projeto, e a todos do laboratório pela companhia e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos amigos do Laboratório de Artrópodes e Hematófagos, em especial a Patrícia e a Martinha por me ajudarem no início dos trabalhos com enzimas, por toda a alegria, paciência, ajuda e carinho que sempre tiveram por mim.

Aos amigos da Cia de Dança Khalida Zareen e da Cia de Dança Álvaro Reis, vocês tornam minha vida uma dança de eterna magia e felicidade. Sem vocês nunca teria o equilíbrio necessário para concluir meu trabalho.

Aos amigos da Casa de Aramis, da FRASANGERMAIN e dos Obreiros do Bem, por me mostrarem que existe muito mais além da matéria e que prática sem estudo não nos leva a lugar algum.

A todos que fizeram e fazem parte da minha vida, mas infelizmente eu não citei porque são muitas pessoas e todos estão no meu coração... Precisaria de umas 20 páginas, no mínimo, para agradecer a todos, pois o que sou hoje, é fruto de tudo que vivi até esse momento. Acho inclusive, que isso daria uma bela tese de psicologia, mas como não é o caso, finalizo deixando meu muito obrigado por vocês existirem e por terem cruzado meu caminho!

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

- . AMPc – adenosina monofosfato cíclico
- . AP-1 - proteína ativadora 1
- . ATP – adenosina trifosfato
- .  $\text{Ca}^{2+}$  - íon cálcio
- . canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  – canais de potássio sensíveis a ATP
- . COX – ciclooxigenase
- . DECA – decanoato de nandrolona
- . DNA - Ácido desoxirribonucléico
- .  $\text{dP}/\text{dt}$  – primeira derivada do registro da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
- .  $\text{dP}/\text{dt}+$  - taxa de encurtamento muscular
- .  $\text{dP}/\text{dt}-$  - taxa de relaxamento muscular
- . EA – esteróide anabólico
- . ECG - eletrocardiograma
- . EGF - fator de crescimento epidérmico
- . FC – frequência cardíaca
- . GPx – enzima glutaciona peroxidase
- . GR – enzima glutaciona redutase
- . GSH - glutaciona na forma reduzida
- . GSSG - glutaciona na forma oxidada
- .  $\text{H}^+$  - próton
- . HDL-C - lipoproteína de alta densidade
- . HIF-1 – fator induzido por hipóxia 1
- . HK – enzima hexocinase
- .  $\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio
- . HSF-1 – fator de transcrição de choque térmico 1
- . HSP – proteína de choque térmico
- . IL-1 – interleucina 1
- . I/R - isquemia-reperfusão
- .  $\text{K}^+$  - íon potássio
- . LDH - enzima lactato desidrogenase
- . LDL-C - colesterol de baixa densidade
- . MAPK - proteínas cinases ativadas por fatores mitogênicos

- . MnSOD – enzima superóxido dismutase isoforma manganes (mitocôndrial)
- . Na<sup>+</sup>. – íon sódio
- . NF-KB – fator nuclear - kappa B
- . NO – óxido nítrico
- . NOS – óxido nítrico sintase
- . NOS<sub>e</sub> - óxido nítrico sintase endotelial
- . NOS<sub>i</sub> - óxido nítrico sintase induzida
- . NOS<sub>n</sub> - óxido nítrico sintase neuronal
- . O<sub>2</sub> – oxigênio
- . O<sub>2</sub><sup>-</sup> - superóxido
- . <sup>1</sup>O<sub>2</sub> - oxigênio singlete
- . ·OH - radical hidroxila
- . PC – pré-condicionamento isquêmico
- . PDVE – pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
- . %PDVE - porcentagem da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
- . PFK – enzima fosfofrutocinase
- . PKC – proteína cinase C
- . PR – medida da duração (tempo) do início da onda P até o início da onda R do ECG
- . PTP - poro de transição mitocondrial
- . QT – medida da duração (tempo) do início da onda Q até o final da onda T do ECG
- . RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
- . ROS – espécies reativas de oxigênio
- . RS - retículo sarcoplasmático
- . SC – sedentário controle
- . SD – sedentário DECA
- . SOD – superóxido dismutase
- . TC – treinado controle
- . TD – treinado DECA
- . TK – tirosina cinase
- . TNF- α – fator de necrose tumoral α
- . TTC – cloreto de trifeniltetrazólio
- . VE – ventrículo esquerdo
- . VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

- . VO<sub>2</sub> máximo – consumo máximo de oxigênio
- . XDH – enzima xantina desidrogenase
- . XO – enzima xantina oxidase

## RESUMO

### **PAPEL DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NA CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO: EFEITOS DELETÉRIOS DO USO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA**

Tem sido mostrado que o exercício é capaz de diminuir o risco das doenças do sistema cardiovascular. Associado ao exercício tem sido encontrado o uso indiscriminado de altas doses de anabolizantes com fins estéticos ou ergogênicos. Apesar dos efeitos deletérios das altas doses de anabolizantes para o sistema cardiovascular, pouco se sabe sobre o impacto do uso destas substâncias sobre a cardioproteção a eventos isquêmicos promovida pelo exercício. Deste modo, este trabalho teve como objetivo inicial avaliar o impacto do uso de altas doses do anabolizante decanoato de nandrolona (DECA) nas injúrias cardíacas geradas pelo insulto de isquemia-reperusão (I/R) em ratos sedentários ou treinados. Posteriormente foram investigados os efeitos do treinamento e do uso do DECA sobre as defesas antioxidantes e sobre algumas enzimas do metabolismo energético durante a I/R cardíaca. Para tal, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos aleatoriamente em 4 grupos: sedentários controle (SC), sedentários tratados com DECA (SD), treinados controle (TC) e treinados tratados com DECA (TD). O período experimental teve a duração de dez semanas, sendo que nas oito semanas finais foi iniciada a administração de DECA (10mg/kg) ou de veículo uma vez por semana. Os grupos treinados foram submetidos ao exercício realizado em esteira ergométrica durante dez semanas. Ao término deste período, os animais foram sacrificados, os corações retirados e submetidos ao protocolo de I/R. A função contrátil foi avaliada durante o protocolo de I/R e a área de infarto foi mensurada ao final do experimento. Em uma etapa posterior do estudo, a atividade das enzimas antioxidantes e de algumas enzimas do metabolismo energético foram avaliadas ao final do período do controle, da isquemia e da reperusão. Os animais TC apresentaram menor área de infarto e melhor recuperação da função contrátil frente aos demais grupos. O grupo TC apresentou maior atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) que os demais grupos, acarretando em um menor estresse oxidativo tecidual. Também foi encontrado um aumento da atividade da hexocinase (HK) e da transferência dos elétrons dos complexos I ao III cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CI-III) nos ratos TC, acarretando em um melhor suprimento energético durante a isquemia e possivelmente durante o início da reperusão. Os efeitos benéficos do treinamento foram abolidos pelo tratamento com DECA. Concluímos que a cardioproteção induzida pelo exercício está relacionada com aumento da capacidade antioxidante enzimática, resultando em uma diminuição do estresse oxidativo tecidual, associado a maior capacidade de ressíntese de ATP durante a isquemia e talvez, no início da reperusão. Estas adaptações foram impedidas pelo uso do DECA nos animais TD, explicando a maior disfunção contrátil e lesão tecidual encontrada neste grupo ao término do insulto de I/R.

**Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPERJ

## ABSTRACT

### ROLE OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES ON EXERCISE INDUCED CARDIOPROTECTION: NEGATIVE EFFECTS OF NANDROLONE DECANOATE TREATMENT

It has been previously reported that physical activity can reduce the risk of cardiovascular diseases. Anabolic steroids are used with the aim of better performance or muscle mass improvement, despite all advices about their deleterious effects to cardiovascular system. The protective effects of exercise in ischemic events are well known, however, the association between exercise and high doses of anabolic steroid in cardiac ischemia/reperfusion (I/R) events are poorly understood. The aim of this study was evaluate the effects of exercise and high doses of anabolic steroid in I/R injuries in isolated rat hearts. At the second phase of this study, we have investigated some mechanisms involved in cardioprotection, such as the activities of antioxidant enzymes and some enzymes of energy metabolism during control, ischemia and reperfusion periods. Male Wistar rats were randomly assigned in a sedentary vehicle group (SC), a sedentary DECA group (SD), a trained vehicle group (TC), and a trained DECA group (TD). Experimental period consisted in ten weeks; during the last eight weeks the animals were treated with 10mg/Kg body weight of DECA or vehicle (peanut oil with 10% of benzyl alcohol). Trained groups were exercised in a treadmill for ten weeks. At the end of the experimental period, the rats were sacrificed, their hearts extrated and submitted to global I/R insult. Developed pressure were registered during all experimental period, and at the end of the I/R and ischemic areas were evaluated. The activities of antioxidant and energy metabolism enzymes were measured at the end of control, ischemia and reperfusion periods. The exercised rats (TC) showed improved contractile function after reperfusion, lower infarct size and increased antioxidant enzyme activities than all the other groups. In the TC group both hexocinase and the complex I to III electron transference of mitochondrial electron transport chain were increased at ischemia period when compared with SC, SD and TD. These results showthat exercise training significantly decreases the I/R damage in the heart. The mechanisms related to this protection involve an improvement of antioxidant enzyme activities and energy metabolism enzymes that were abolished by chronic administration of DECA to trained rats.

**Financial support:** CAPES, CNPq, FAPERJ.

**ÍNDICE**

Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Abreviaturas	IX
Resumo	XI
Abstract	XII
Índice	XIII
Índice de Figuras e Tabelas	XVI
<b>1. Introdução</b>	01
1.1. As doenças do sistema cardiovascular como um problema de saúde pública	01
1.2. Isquemia/Reperusão como mecanismo gerador de lesões nas doenças cardiovasculares	02
1.2.1 Papel das Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes na I/R	06
1.3. Cardioproteção: Fenômeno, mecanismos indutores e efetores	12
1.3.1 Papel do Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) na cardioproteção	15
1.4. O Exercício como terapia cardioprotetora	16
1.4.1. Exercício: Mecanismos Agudos de Cardioproteção	17
1.4.2. Exercício: Mecanismos Crônicos de Cardioproteção	19
1.4.3. Outras Adaptações Fisiológicas ao Treinamento	22
1.5. Esteróides Anabólicos: Origem e Efeitos Colaterais	23
1.5.1. Efeitos não genômicos dos EA: alterações comportamentais	24
1.5.2. Efeitos Genômicos dos EA	25
1.5.3. Superdosagem de EA: melhora do desempenho e da beleza física versus a perda silenciosa da saúde do corpo	25
1.5.4. Decanoato de Nandrolona (DECA): síntese e metabolização	27
1.6. Exercício e Anabolizantes: a saúde versus a doença	28
<b>2. Objetivos</b>	30
<b>3. Materiais e Métodos</b>	31
3.1. Seleção dos Animais	31
3.2. Treinamento e Tratamento dos Animais	32
3.3. Eletrocardiograma (ECG) <i>in vivo</i>	34
3.4. Experimentos com Coração Isolado	36

3.5. Avaliação da Área de Infarto	39
3.6. Análises Espectrofotométricas	40
3.7. Análises Estatísticas	46
<b>4. Resultados</b>	47
4.1. Efeito do exercício e do tratamento com DECA no peso corporal e dos tecidos dos ratos	47
4.2. Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre o ECG ( <i>in vivo</i> )	48
4.3. Efeito do exercício e do tratamento com DECA sobre as funções cardíacas <i>in vitro</i> (Coração Isolado)	49
4.3.1. Respostas da função contrátil do ventrículo esquerdo (VE) <i>in vitro</i> ao exercício e tratamento com DECA	49
4.3.2. Efeitos do exercício e do DECA no ECG do coração isolado	50
4.3.3. Isquemia/Reperusão (I/R): o exercício e o DECA alteram a tolerância do tecido ventricular a isquemia?	51
4.3.3.1. O exercício e o tratamento com DECA interferem nas alterações da Pressão Diastólica (PD) observadas durante o insulto de I/R?	52
4.3.3.2. Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo (PDVE) durante a I/R: o tratamento com DECA aboliu os efeitos positivos do exercício	53
4.3.3.3. Área de infarto: O tratamento com DECA promoveu maior lesão na I/R	54
4.3.3.4. Cardioproteção contra lesões de I/R: influência do exercício e do tratamento com DECA na atividade das enzimas antioxidantes	55
4.3.3.5. Influência do exercício e do DECA na atividade das enzimas do metabolismo energético durante a I/R	63
<b>5. Discussão</b>	69
5.1 Efeito do exercício e do tratamento com DECA no peso corporal e dos tecidos dos ratos	70
5.2 Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre a função elétrica cardíaca <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	72
5.3. Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre a função cardíaca e a tolerância ao evento de I/R <i>in vitro</i>	74
5.4 Mecanismos cardioprotetores	77
5.4.1 Enzimas antioxidantes e tióis	77
5.4.2 Enzimas do metabolismo energético	84
<b>6. Conclusões</b>	89
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	92
<b>8. Apêndice</b>	110

**ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS**

. Figura 1: trocador $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{+2}$ na I/R	04
. Figura 2: XO na I/R	05
. Figura 3: Cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria	08
. Figura 4: Formação de superóxido na mitocôndria	09
. Figura 5: Vias de produção e detoxificação de ROS	10
. Figura 6: Sinalização envolvida no PC cardíaco	15
. Figura 7: Estrutura da Testosterona e do DECA	28
. Figura 8: Esteira ergométrica utilizada no treinamento dos ratos	32
. Figura 9: Protocolo de treinamento	34
. Figura 10: Traçado de ECG	35
. Figura 11: Montagem de Langendorf	37
. Figura 12: Registro de Pressão e dP/dt	38
. Figura 13: Gráfico dP/dt	50
. Figura 14: Gráfico %PDVE durante a I/R	53
. Figura 15: Gráfico de área de infarto pós I/R	55
. Figura 16: Gráficos de atividade das enzimas antioxidantes	57
. Figura 17: Gráfico atividade SOD durante I/R	59
. Figura 18: Gráfico atividade Catalase durante I/R	60
. Figura 19: Gráfico atividade GPx durante I/R	61
. Figura 20: Gráfico atividade GR durante I/R	62
. Figura 21: Gráfico dos níveis de tióis durante I/R	63
. Figura 22: Gráfico atividade HK durante I/R	65
. Figura 23: Gráfico atividade LDH durante I/R	66
. Figura 24: Gráfico atividade CS durante I/R	67
. Figura 25: Gráfico atividade CI-III durante I/R	68
. Tabela 1: Peso corporal e peso do coração	47
. Tabela 2: Peso relativo dos tecidos corporais	48
. Tabela 3: FC, PR e QT <i>in vivo</i>	49
. Tabela 4: FC, PR e QT em corações isolados	51
. Tabela 5: Valores de Pressão diastólica durante a I/R	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. AS DOENÇAS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

As doenças do sistema cardiovascular têm crescido consideravelmente nas últimas décadas em todo o mundo, implicando em um grande gasto público com o sistema de saúde (American Heart Association Statistica Update, 2002; Laurenti, 1982; Laurenti et al, 2000). No Brasil, as doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade, contribuindo com cerca de 32,5% de todos os óbitos (Ministério da Saúde, 2006). No período de janeiro de 1995 a junho de 2005, segundo dados do Ministério da Saúde, 10,34% do total de internações registradas foram por doenças do aparelho circulatório, correspondendo a 17,37% dos gastos. Dentre as principais doenças cardiovasculares, o grupo das doenças isquêmicas do coração parece ser o segundo mais prevalente, responsável por 30,4% dos óbitos (Ministério da Saúde, 2006).

As doenças cardiovasculares são um problema endêmico resultante de uma série de alterações hormonais, metabólicas e estruturais, podendo envolver ativação excessiva do sistema nervoso simpático, hipercortisolemia, aumento do colesterol plasmático e aterosclerose (Rozanski et al., 1999; Powers, 2003). Tais alterações são provenientes do somatório de vários fatores como estilo de vida sedentário, má alimentação (dieta rica em gordura saturada e gorduras animais), tabagismo, problemas psicológicos e sociais (tais como depressão, ansiedade, isolamento social e estresse crônico), dentre outros (Rozanski et al., 1999; Powers, 2003). Contudo, vários trabalhos têm mostrado que este quadro pode ser amenizado ou até evitado através da prática de atividade física moderada e da aquisição de uma dieta balanceada (MRFIT Reserch Group, 1982; WHO European Collaborative Group, 1986; Berlin & Colditz, 1990; Lee et al., 1995; Welin et al., 1995; Rozanski et al., 1999; Blom et al., 2003; Powers, 2003).

## 1.2. ISQUEMIA/REPERFUSÃO COMO MECANISMO GERADOR DE LESÕES NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A isquemia-reperfusão (I/R) cardíaca representa um importante problema clínico associado a procedimentos cirúrgicos como a trombólise, a angioplastia e o transplante. É caracterizada pelo impedimento temporário do fluxo sanguíneo, devido à formação de trombos, a placa aterosclerótica ou ao colapso de um vaso, resultando em uma isquemia tecidual (Dhalla et al, 2000). A isquemia é caracterizada por um quadro de escassez no suprimento de  $O_2$  e pode ocorrer de forma rápida e transitória, ativando mecanismos protetores. Quando a isquemia persiste por um período mais longo, pode culminar em danos celulares irreparáveis e morte celular (Semenza, 2000a). Assim que o fluxo sanguíneo é restabelecido, seja por evento fisiológico ou por intervenção cirúrgica, é iniciado o período de reperfusão. Quanto maior o período de isquemia, maior a gravidade das injúrias teciduais encontradas na reperfusão. Dentre os distúrbios desencadeados pela I/R encontramos as arritmias cardíacas, as lesões microvasculares, o atordoamento (que é a perda da função contrátil) do miocárdio com disfunções mecânicas reversíveis e a morte celular em último estágio. É importante ressaltar que estes eventos podem ocorrer separadamente ou agrupados (Dhalla et al, 2000).

Durante a isquemia, a queda no suprimento de  $O_2$  acarreta em déficit na produção de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – detalhes de como essas espécies são geradas encontra-se no tópico 2.1 do texto). Como a principal via responsável pelo suprimento energético no músculo cardíaco é a via aeróbia, a ressíntese de ATP desse tecido é prejudicada devido à diminuição progressiva dos níveis de  $O_2$ . Há uma sobrecarga do metabolismo glicolítico, tentando suprir as necessidades celulares, culminando em acúmulo de lactato, e conseqüente diminuição do pH intracelular. Apesar da sobrecarga na via glicolítica, esta não é capaz de fornecer o ATP necessário para manutenção das funções basais da célula, resultando na queda dos níveis de ATP. A diminuição dos níveis de ATP comprometem o funcionamento de ATPases, como a  $Na^+K^+$  ATPase presentes na membrana plasmática e a  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático, acarretando na perda do potencial de membrana e aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares. Corroborando com este quadro de estresse, a acidose intracelular ativa o trocador  $Na^+H^+$ , levando ao aumento dos

níveis intracelulares de  $\text{Na}^+$ . O aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular faz com que o trocador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  funcione de maneira reversa (transportando  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol), colaborando com a sobrecarga dos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 1) observados durante a isquemia (Dhalla et al, 2000; Avkiran & Marber, 2002; Paccher et al, 2006).

O estresse oxidativo (evento caracterizado por um desequilíbrio no balanço pró-oxidante e antioxidante celular, favorecendo o estado pró-oxidante, acarretando em dano celular), e a sobrecarga do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , parecem ser os responsáveis pelas lesões geradas nos eventos de I/R. O estresse oxidativo causa a oxidação de substâncias antioxidantes endógenas, além da peroxidação de lipídeos e de proteínas, promovendo alterações da permeabilidade e da configuração das membranas e das funções celulares. Neste sentido, a redução da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e da  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPase sarcolemas, causadas pelo estresse oxidativo e pela diminuição dos níveis de ATP, resultam em diminuição tanto do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto no aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (RS) também é prejudicada, impedindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  seja recaptado para o RS, agravando a sobrecarga citossólica desse íon (Dhalla et al, 2000; Droge, 2002). O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante a isquemia também atua potencializando os danos oxidativos na reperfusão através da conversão da enzima xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO), resultando na geração do radical superóxido (figura 2) (Pacher et al, 2006).

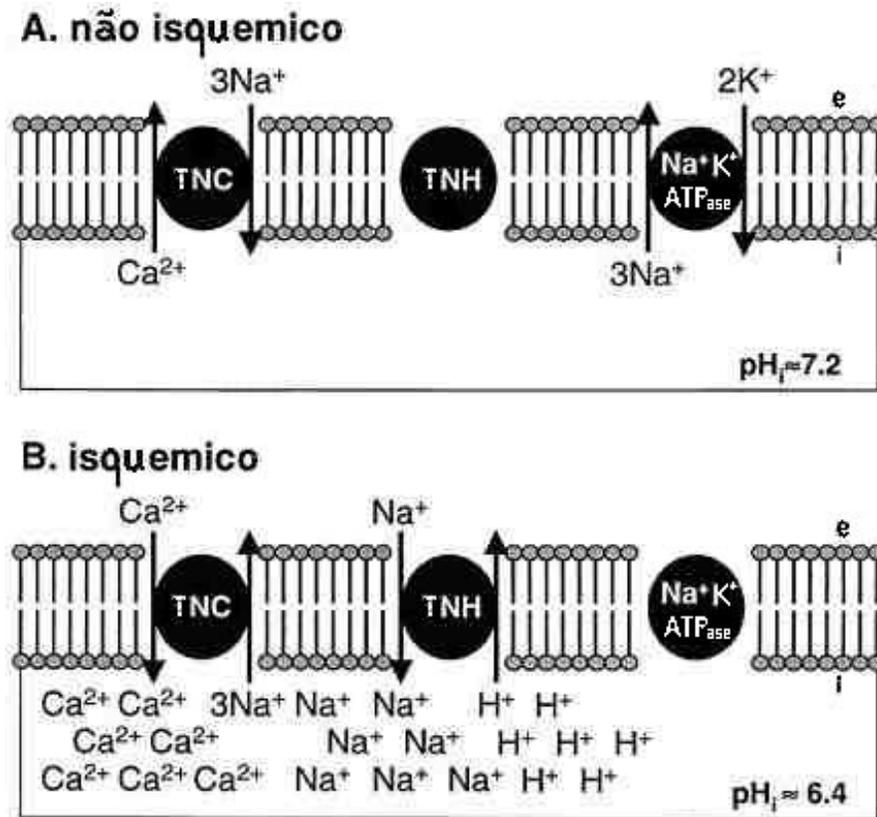


Figura 1: Mecanismo pelo qual o trocador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  (TNC) atua contribuindo para a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrada na isquemia reperusão. A - durante a normóxia a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase atua promovendo o efluxo de  $\text{Na}^+$  e o influxo de  $\text{K}^+$  celular às custas da hidrólise de ATP, e o TNC trocando o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelo  $\text{Na}^+$  extracelular. Nesta condição o trocador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (TNH) encontra-se inativo. B - a isquemia promove diminuição dos níveis de  $\text{O}_2$  citossólicos, comprometendo a ressíntese de ATP pelo metabolismo aeróbio, levando a diminuição progressiva nos níveis de ATP intracelular, impossibilitando a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase. Concomitantemente, há uma maior solicitação do metabolismo glicolítico, tentando manter os níveis de ATP celular, acarretando em diminuição do pH, e ativação do NHE (devido ao acúmulo de prótons) levando ao aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular ( $\text{Na}^i$ ). O aumento do  $\text{Na}^i$  faz com que o NCX funcione de modo reverso, trocando o  $\text{Ca}^+$  extracelular pelo  $\text{Na}^+$  intracelular, aumentando ainda mais os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (adaptado de Avkiran & Marber, 2002).

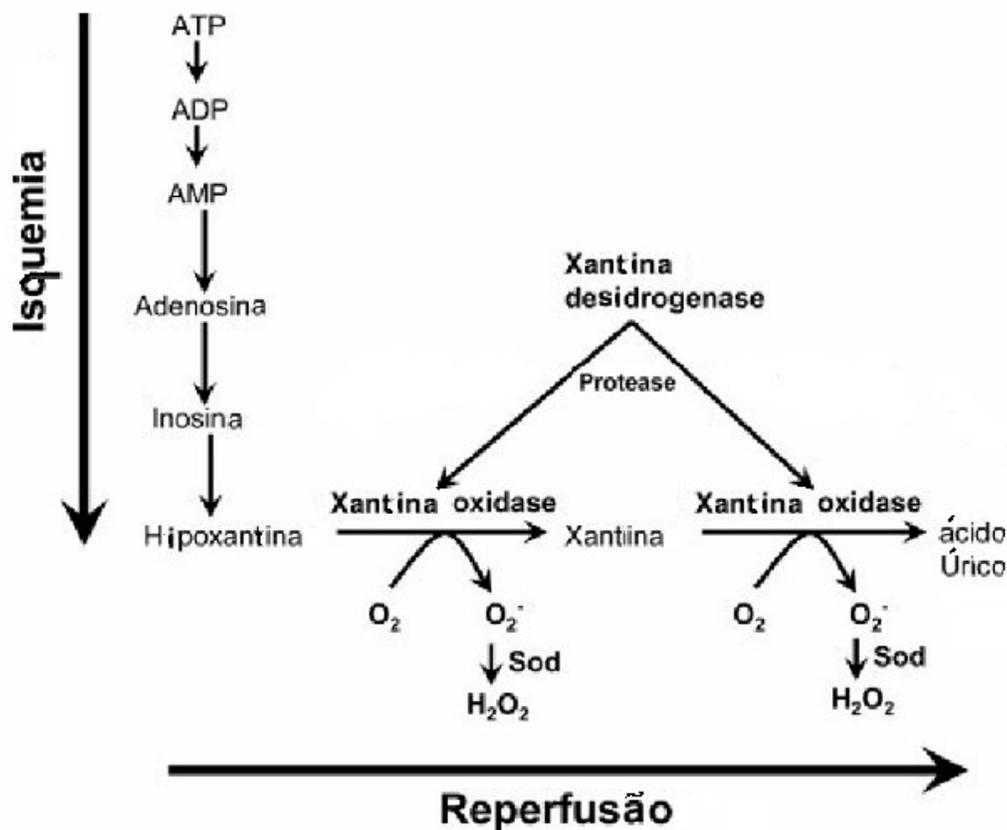


Figura 2: Hipótese do agravamento das injúrias geradas pela isquemia reperfusão pela conversão da xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO). Durante a isquemia o gradiente transmembrana iônico é dissipado. O cálcio citosólico aumenta, ativando proteases que convertem irreversivelmente a XDH em XO. Ao mesmo tempo, o ATP celular é catabolizado, sendo acumulado na forma de hipoxantina. Durante a reperfusão, o oxigênio que foi restabelecido nas células, juntamente com a hipoxantina gerada durante a isquemia são utilizados pela XO produzindo o superóxido e peróxido de hidrogênio, agravando o quadro de estresse oxidativo iniciado durante a isquemia (adaptado de Pacher et al, 2006).

A conversão da XDH em XO pode acontecer de modo reversível, ou irreversível, dependendo do mecanismo. É reversível quando ocorre em condições de estresse oxidativo, onde algumas cisteínas da enzima são oxidadas mudando a atividade da mesma. É irreversível se é desencadeada pela atuação de proteases como a tripsina, quimiotripsina ou pancreatina (Berry & Hare, 2004). O papel da conversão da XDH em XO nas injúrias geradas na reperfusão foi proposto pela primeira vez pelo grupo de Grander (1981), em modelo de intestino. Segundo este trabalho, o catabolismo de ATP gerado pela ausência de oxigênio durante a isquemia, levaria ao aumento dos níveis de hipoxantina, que na reperfusão seria usada pela XO gerando superóxido (figura 3). Em outro estudo foi demonstrado que a XDH pode apresentar uma função NADH oxidase. Quando o pH celular cai para 6,5, achado

comum na isquemia, a XDH passa a exibir preferência para oxidação de NADH ao invés da xantina. Além disso, as concentrações de NADH costumam subir de 2-6 vezes na isquemia o que poderia agravar a produção de superóxido via XDH. Outro achado interessante é que a taxa de formação de superóxido através da função NADH oxidase da XDH, é cerca de 4 vezes maior que a da XO, sugerindo que a conversão de XDH para XO não seria necessária para as injúrias da I/R mediadas pelo superóxido (Berry & Hare, 2004). A importância da XO e do estresse oxidativo na lesão cardíaca foi confirmado posteriormente em estudos utilizando alopurinol, que é uma droga capaz de inibir a atividade da XO, e de antioxidantes (Brown et al, 1988; Terada et al, 1991). Abordando particularmente o papel da XO, foi demonstrado em inúmeros trabalhos que o tratamento com inibidores da XO foi capaz de atenuar o estresse oxidativo e a disfunção ventricular desencadeados pela I/R (Brown et al, 1988; Terada et al, 1991; Berry & Hare, 2004; Paccher et al, 2006)

### 1.2.1 Papel das Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes na I/R

Radicais livres são moléculas ou átomos cuja principal característica é possuir um ou mais elétrons desemparelhados em um de seus orbitais. Por conta desta instabilidade tendem a reagir com outras moléculas fazendo deles substâncias extremamente reativas. A formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer tanto por processos enzimáticos quanto não enzimáticos tais como: NAD(P)H oxidase, XO, lipooxigenase, ciclooxigenase, citocromo P450, NOS, peroxidases e complexos mitocondriais da cadeia respiratória (Dröge, 2002; Gutteridge, 1995; Sen, 1995).

A hipóxia tecidual promovida pela isquemia desencadeia um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria. Este processo ocorre através do fluxo de elétrons nos quatro complexos da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Os complexos mitocondriais são as estruturas responsáveis por gerar o gradiente eletroquímico entre a matriz e o espaço intermembrana (figura 3), permitindo que o complexo V, conhecido como ATP sintase, funcione no sentido de produção de ATP a partir do ADP + Pi. O oxigênio (O<sub>2</sub>) é importante neste processo, pois atua como acceptor final de elétrons no complexo IV, permitindo o fluxo de elétrons nos complexos anteriores. A geração de

ROS ocorre através do “vazamento” desses elétrons, gerando o superóxido. A ausência ou a diminuição na concentração do  $O_2$  diminui a velocidade do fluxo de elétrons, aumentando a possibilidade de geração de ROS, além de diminuir o gradiente eletroquímico da mitocôndria promovendo a diminuição da produção de ATP pela ATP sintase.

O superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é formado por várias vias celulares (figura 2, 4 e 5). Nos eventos de isquemia/reperfusão (I/R), em diferentes tecidos (como coração, cérebro, fígado, intestino, dentre outros), foi observado que as vias da XO e da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria são as fontes mais importantes geradoras de estresse oxidativo. A XO, como comentado anteriormente, oxida a hipoxantina ou a xantina em xantina ou ácido úrico, respectivamente, gerando o radical  $O_2^{\cdot-}$  (figura 2). A produção de  $O_2^{\cdot-}$  na mitocôndria ocorre nos complexos I, II e III da cadeia transportadora de elétrons (figura 4). Tais complexos contêm vários centros redoxes que permitem o vazamento de elétrons para o  $O_2$ . Por conta disso, cerca de 1-2% do oxigênio utilizado na mitocôndria forma o radical  $O_2^{\cdot-}$ , constituindo, desta forma, a maior fonte de  $O_2^{\cdot-}$  de diferentes tecidos (Dröge, 2002; Turrens, 2003, Lindford et al, 2006, Pacher et al, 2006).

A partir do  $O_2^{\cdot-}$  podem ser formadas espontaneamente duas espécies não radicalares, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), ou somente o  $H_2O_2$  através da enzima superóxido dismutase (SOD) (figura 4 e 5). O  $H_2O_2$  também pode ser produzido por enzimas como a urato oxidase, a glicose oxidase e a monoamino oxidase (Dröge, 2001; Gutteridge, 1995). As espécies radicalares mais reativas são formadas a partir da interação de metais de transição reduzidos (como os íons cobre e ferro) com o  $H_2O_2$  formando o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ). No entanto, na presença da glutathione peroxidase (GPx) ou da catalase, o  $H_2O_2$  é convertido em espécies não reativas, como a glutathione oxidada (GSSG) e a água, no caso da GPx, ou água e oxigênio, no caso da catalase (figura 5). A enzima GPx necessita de glutathione na forma reduzida (GSH) para detoxificar tanto o  $H_2O_2$  quanto peróxidos orgânicos. Desta forma, a glutathione redutase (GR) participa como enzima antioxidante acessória, reduzindo a GSSG em GSH às custas da oxidação do NADPH. Apesar de não participar diretamente da detoxificação de radicais livres, a GR exerce um papel fundamental, pois sua inativação ou diminuição de atividade pode interferir na manutenção dos níveis de GSH celular, acarretando na diminuição

da atividade ou até da inativação da GPx pela disponibilidade reduzida de substrato (Davies Jr et al, 2001; Dröge, 2001).

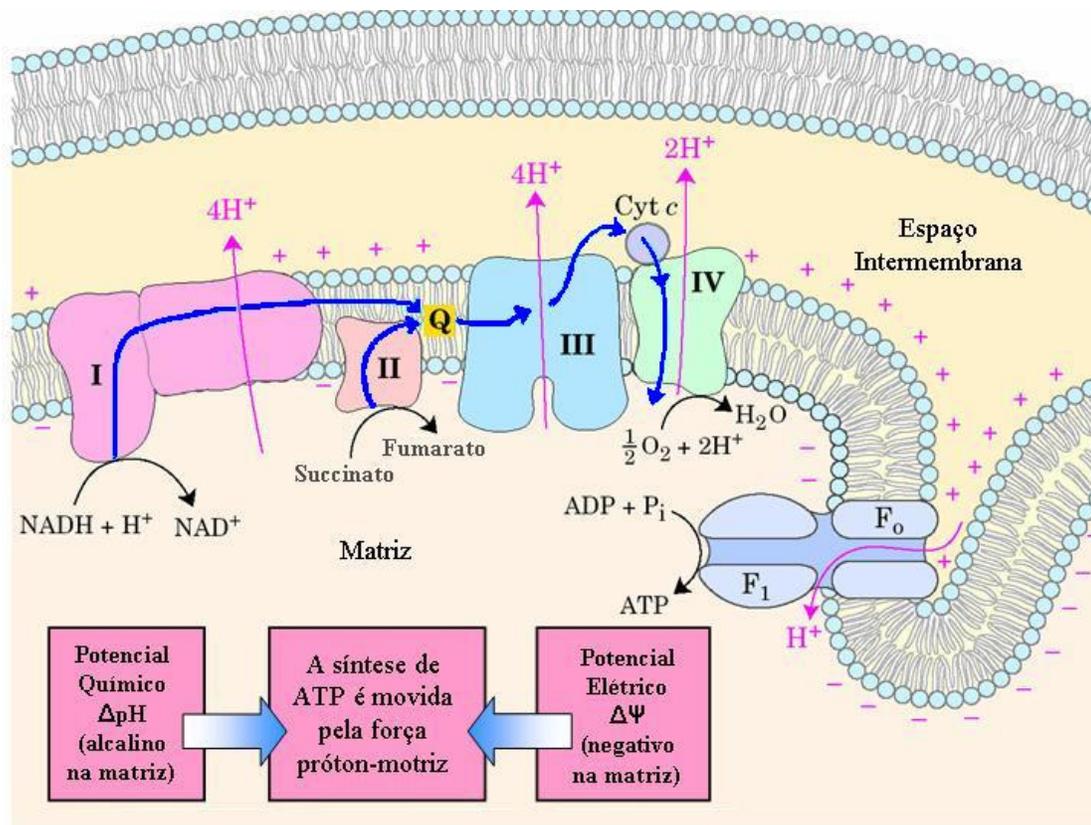


Figura 3: Papel do fluxo de elétrons na geração do gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP. Os elétrons entram na cadeia transportadora de elétrons no complexo I, através da oxidação do NADH ou do complexo II, pela oxidação do succinato em fumarato. Estes elétrons são transferidos para a coenzima Q (Q) que é reduzida de ubiquinona em ubiquinol. No Complexo III a Q é oxidada em semiquinona, transferindo seus elétrons para o citocromo C, que é oxidado no complexo IV, reduzindo o oxigênio em água. Na ausência de O<sub>2</sub>, o citocromo não é oxidado, congestionando o fluxo de elétrons nos complexos anteriores. O fluxo de elétrons na cadeia transportadora promove o bombeamento de prótons nos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico entre a matriz e o espaço intermembrana. Tal gradiente permite que os prótons retornem para a matriz através da ATP sintase, promovendo a síntese de ATP a partir do ADP e do P<sub>i</sub> (adaptado de Lehninger, 2005).

citoplasma

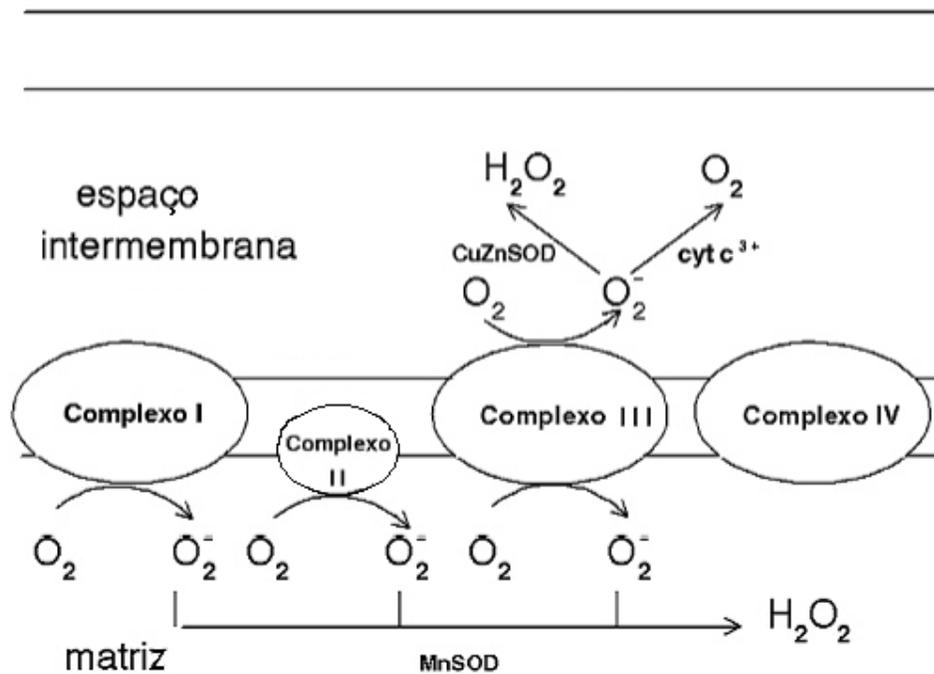


Figura 4: Sítios de formação de superóxido na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Vários complexos respiratórios permitem o vazamento de elétrons do oxigênio ( $O_2$ ) produzindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que pode reduzir o citocromo C ou ser dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Aumentos nas concentrações  $O_2^-$  podem promover aumentos nos níveis de peroxinitrito, ao interagir com o óxido nítrico. O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode reduzir metais de transição produzindo o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Tanto o peroxinitrito quanto o  $OH^\cdot$  são espécies extremamente reativas podendo interagir e danificar lipídeos, proteínas e DNA (adaptado de Turrens, 2003).

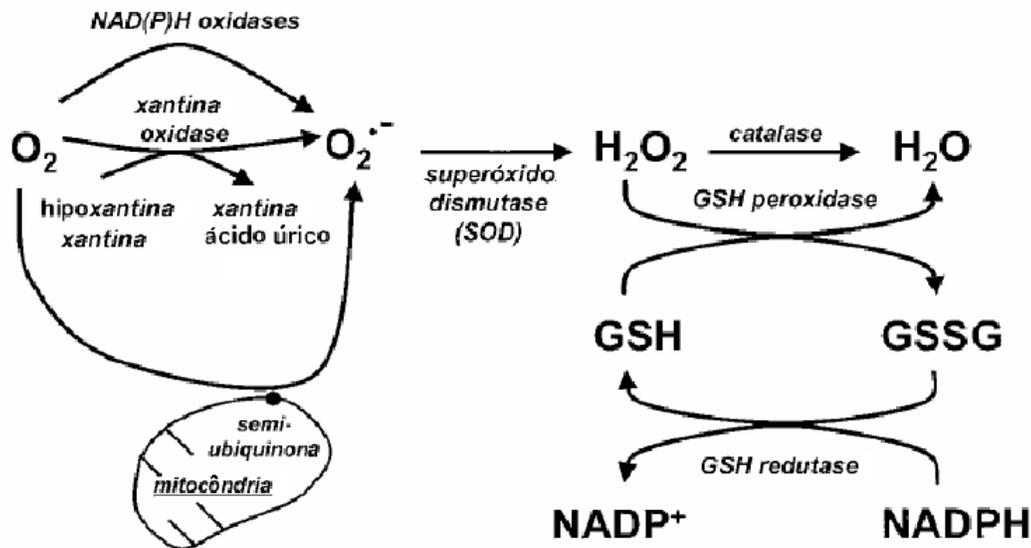


Figura 5: Vias de produção e detoxificação de ROS. O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é gerado a partir do oxigênio ( $O_2$ ) na mitocôndria ou através de enzimas como a xantina oxidase e a NAD(P)H oxidase. A partir do ( $O_2^{\cdot-}$ ) é formado o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que é neutralizado por duas outras enzimas: A catalase, formando água ( $H_2O$ ) e  $O_2$ , como produtos; A glutathione peroxidase (GSH peroxidase), que às custas da oxidação da glutathione (forma reduzida - GSH) produz glutathione oxidada (GSSG) e água. A atividade da GSH peroxidase depende dos níveis de GSH. Estes são mantidos através da GSH redutase, que reduz a GSSG em GSH por meio da oxidação de NADPH em NADP (adaptado de Dröge, 2002).

A via não enzimática de neutralização das ROS é composta por substâncias com grande potencial redutor, cuja principal característica é que mesmo em baixas concentrações são capazes de prevenir ou retardar a oxidação de substratos oxidáveis celulares, tais como lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA. Dentre os antioxidantes não enzimáticos encontramos substâncias como o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol, a vitamina B<sub>6</sub>, o ácido dihidrolipoato e os tióis. Estes últimos, em particular, são formados por vários compostos protéicos e não protéicos contendo grupos sulfidril, tais como glicina, ácido glutâmico, tripeptídeo cisteína e GSH. O balanço redox dos tióis é importante, pois pode regular a atividade de várias enzimas e de canais (Sen, 1995). Por exemplo, a abertura do canal  $K_{ATP}$  mitocondrial é inibida por estados mais redutores, enquanto que o deslocamento desse balanço para estados mais oxidados favoreceria a abertura (Facundo et al, 2006). Já a GSH seria capaz de bloquear a atividade da caspase, no processo de apoptose, porém em baixas concentrações, pode limitar a atividade da GPx,

prejudicando uma das importantes vias enzimáticas de detoxificação do  $H_2O_2$  (Davies Jr et al, 2001).

O balanço entre geração e detoxificação das ROS é um processo complexo dependente de múltiplas reações enzimáticas e não-enzimáticas, onde o perfil antioxidante é um ponto determinante para homeostase celular. Segundo a revisão de Sen (1995), o estado antioxidante celular, quando em equilíbrio, atua:

1. Prevenindo a formação de ROS;
2. Diminuindo o ataque das ROS, através da detoxificação dos metabólitos reativos em moléculas menos reativas;
3. Evitando a conversão das ROS menos reativas (como o  $O_2^{\cdot-}$ ) em mais reativas (como  $\cdot OH$ );
4. Reparando as lesões geradas pelas ROS, através da expressão de genes que codificam proteínas antioxidantes e de reparo celular;
5. Providenciando um meio favorável para o funcionamento efetivo dos antioxidantes (mantendo níveis adequados de cofatores enzimáticos ou o estado redox celular).

A produção de espécies reativas e a relação delas com as defesas antioxidantes teciduais desempenham um importante papel na função celular. Apesar dos efeitos deletérios das ROS, seus níveis basais são importantíssimos. Vias celulares como as do óxido nítrico, da guanilato ciclase, do fator de crescimento epidermal (EGF), da apoptose, do NF- $\kappa B$ , do TNF- $\alpha$  dentre outros são ativadas por espécies reativas. Desta forma, as ROS regulam funções como: tônus vascular, angiogênese, expressão e síntese de proteínas e morte celular. Quando a produção de ROS supera a capacidade antioxidante e de reparo celular, ocorrem as lesões em lipídeos, proteínas e no DNA, podendo acarretar em morte celular (Sen, 1995; Dröge, 2001). A peroxidação lipídica promove perda da fluidez da membrana e do alinhamento dos receptores, culminando na lise celular. A lesão oxidativa em enzimas e proteínas pode gerar desde a inativação até a agregação, degradação e desnaturação das mesmas. Em ácidos nucleicos pode causar mutações carcinogênicas no DNA gerando particularmente 8-oxoguanina uma base nitrogenada altamente susceptível ao ataque radicalar (Halliwell & Gutteridge, 2007). Os maiores responsáveis pelas lesões oxidativas teciduais são os radicais peróxido, hidroxila, e o superóxido. Além deles, aldeídos provenientes da oxidação e

degradação de ácidos graxos poliinsaturados também podem promover lesões oxidativas. Como exemplos dessas substâncias, encontramos o malondialdeído e o hidroxinonenal, atuando através de reação cruzada com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Machlin & Bendich, 1987).

### 1.3. CARDIOPROTEÇÃO: FENÔMENO, MECANISMOS INDUTORES E EFETORES

A capacidade de adaptação do coração a variados estresses, tornando-o mais resistente a injúrias isquêmicas é conhecido como cardioproteção. Ela pode ser proveniente de vários tipos de estresse, como curtos episódios isquêmicos (fenômeno conhecido como pré-condicionamento isquêmico – PC), exercício e choque térmico. A cardioproteção é um fenômeno complexo cujos mecanismos não estão totalmente elucidados. Apesar disso, sabe-se que é resultante da ativação e interação de numerosas cascatas de sinalizações celulares, síntese de proteínas e aumento da atividade de enzimas (Napoli et al., 2000; Benjamin & Christians, 2002; Hamilton et al. 2003).

O PC pode ser ativado por episódios isquêmicos de curta duração (cerca de 5 minutos), causado por pequenos trombos que obstruem momentaneamente a circulação, por perfusão hipóxica, por estresse oxidativo (gerado por alta pressão de oxigênio), taquicardia, exercício, estresse mecânico (estiramento), altas temperaturas, agentes químicos (como hormônios e cálcio) e farmacológicos (Bolli, 2000; Napoli et al, 2000; Power, 2003; Zaugg et al, 2003). Ocorre em vários tecidos, como o coração, cérebro, medula espinhal, retina, fígado, pulmões e músculo esquelético, e apresenta duas janelas temporais de proteção. A primeira janela, a aguda, promove proteção de minutos até 2-3 horas após sua ativação e a segunda, também conhecida como tardia, surge somente depois de 12-24 horas perdurando até 3-4 dias (Bolli, 2000; Napoli et al., 2000; Zaugg et al, 2003).

Dentre os mecanismos responsáveis pela primeira janela de PC cardíaco (figura 4 – lado esquerdo), destacamos a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, de receptores de opióides, de adenosina e de bradicinina (tipo  $B_2$ ). Tais receptores agem ativando a proteína G e conseqüentemente a proteína cinase C (PKC). A PKC modula canais de potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) sarcolemais e mitocondriais. Os canais  $K_{ATP}$  sarcolemais promovem hiperpolarização das células cardíacas,

diminuindo com isto o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, presentes na membrana celular, amenizando a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólica. Uma outra via importante que atua na iniciação, mas não na manutenção do PC, é a da tirosina cinase (TK). Ela agiria de forma semelhante a da PKC, através da fosforilação de proteínas cinases ativadas por fatores mitogênicos (MAPK) (Napoli et al, 2000; Zaugg et al, 2003).

No que diz respeito ao papel específico da mitocôndria na primeira janela do PC, encontramos relatos de inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Segundo Silva et al (2003), esta inibição atuaria aumentando a formação de ROS no período pré-isquemia, ativando os canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocôndrias, levando a diminuição da produção de ROS no período de reperfusão. Corroborando com esse estudo, Kowaltowski et al (2001) propôs que a abertura destes canais funcionaria diminuindo o inchamento, preservando a função e estrutura da mitocôndria, mantendo o transporte de ATP para o citossol e amenizando a perda das funções celulares durante a I/R. Nas revisões de Hoek et (2000) e de Zaugg et al (2003), encontramos que além das ROS, a PKC e o NO também seriam capazes de ativar os canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondriais (figura 4A). Estes canais promoveriam o influxo de  $\text{K}^{+}$  para a matriz mitocondrial, levando a uma modesta despolarização da membrana interna. Embora pequena, a modesta despolarização seria capaz de atenuar o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria através da diminuição da força iônica para captação deste íon. A diminuição do acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a isquemia melhoraria os níveis de ATP durante a I/R, prevenindo a abertura do poro de transição mitocondrial (PTP). A transição de permeabilidade mitocondrial é um ponto importante na fisiologia celular e é caracterizada pela abertura do PTP no modo de alta condutância, permitindo que solutos de até 1,5 kDa atravessem a membrana interna da mitocôndria de forma não seletiva. Essa permeabilidade da membrana interna pode resultar na perda de componentes da matriz, no inchamento da membrana interna e conseqüentemente, ruptura das membranas externa e interna da mitocôndria (Weiss et al, 2003). Além da sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , a abertura deste poro pode ser estimulada tanto pela produção exacerbada de ROS, comumente encontrada no período de reperfusão (Weiss et al, 2003; Kowaltowski et al, 2001).

A segunda janela de cardioproteção (figura 4 – B) pode ser estimulada pela isquemia, exercício, choque térmico e estimulação ventricular rápida. É comum relacionar a cascata desta janela a 3 componentes: 1) Iniciadores - espécies

moleculares geradas durante o primeiro episódio isquêmico dando início a resposta adaptativa; 2) Efetores (ou mediadores) - moléculas expressas no tecido de 24 a 72 horas depois do evento, responsáveis pela proteção durante o segundo episódio isquêmico; 3) vias de sinalização ativadas pelos iniciadores, que culminam na expressão dos efetores (Bolli, 2000; Napoli et al., 2000).

Dentre as moléculas envolvidas no PC tardio destacamos:

- Iniciadoras: a adenosina, o óxido nítrico (NO), as ROS e os opióides (Bolli, 2000).
- Efetores: a óxido nítrico sintase (NOS), e seus subtipos: endotelial (NOS<sub>e</sub>), induzida (NOS<sub>i</sub>) e neuronal (NOS<sub>n</sub>); a ciclooxigenase-2 (COX-2); a aldose redutase; as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR); as proteínas de choque térmico (HSP) e os canais K<sub>ATP</sub> (Bolli, 2000).
- Sinalização: ativação de cinases (PKC, TK, MAPK) e de fatores transcricionais, como o fator nuclear-κB, responsável pela expressão sustentada das proteínas geradoras do PC tardio (figura 4) (Bolli, 2000).

Várias destas alterações também são encontradas em indivíduos e animais submetidos ao exercício, explicando assim a cardioproteção encontrada em praticantes de atividade física e atletas (Bolli, 2000; Powers, 2003).

A proteção à isquemia no PC tardio é dependente basicamente do aumento de proteínas protetoras e da síntese de NO (figura 4 – lado direito). O NO passa a ter um papel mais importante, devido ao aumento de sua síntese. Ele atua inibindo o influxo de Ca<sup>2+</sup>, antagonizando a estimulação dos receptores β-adrenérgicos, reduzindo a contratilidade e o consumo de O<sub>2</sub> miocárdico, abrindo os canais de K<sub>ATP</sub>, ativando a COX-2 juntamente com a síntese de prostanóides. Outras enzimas associadas com o PC tardio são a aldose redutase, convertendo o sorbitol a glicose e detoxificando os aldeídos lipídicos; a Mn-SOD (cujo papel será abordado com mais profundidade posteriormente) reduzindo o estresse oxidativo; e a proteína anti-apoptótica Bcl-2, dificultando o processo de apoptose celular (Zaugg et al, 2003).

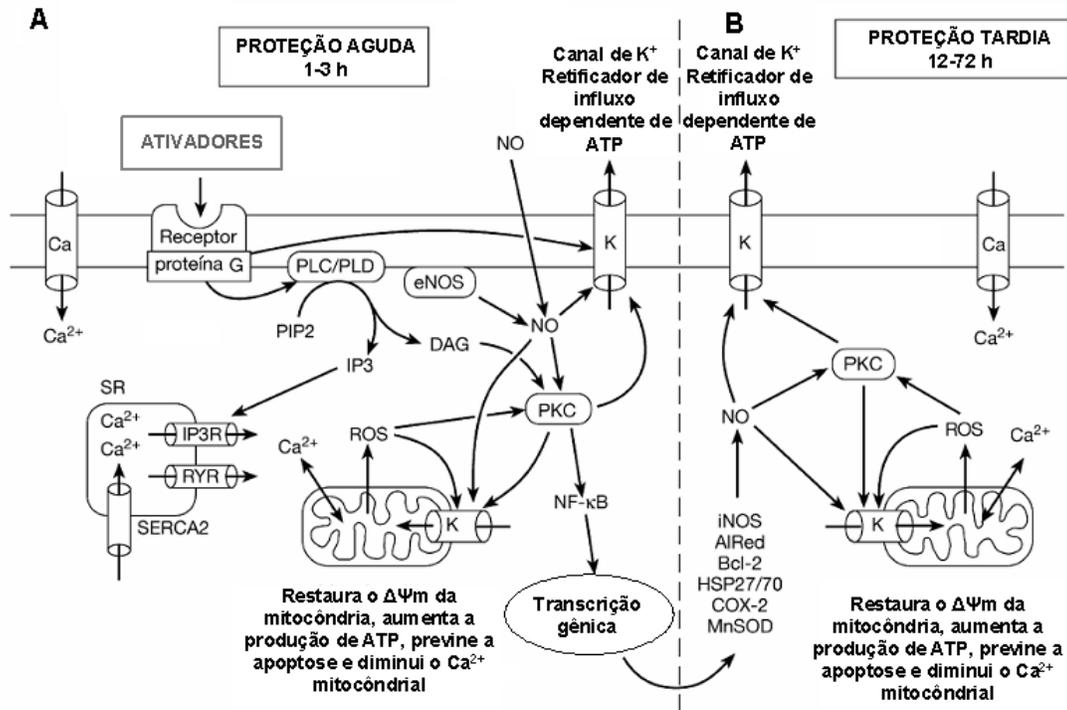


Figura 6: Sinalização envolvida no pré-condicionamento (PC) cardíaco. Os componentes de sinalização descritos ilustram os mecanismos da primeira (A) e da segunda janela (B) do PC.  $\Delta\Psi$  = potencial da membrana interna da mitocôndria; A1Red = aldose redutase; Bcl-2 = proteína anti apoptótica; Ca = canal de cálcio sarcolemal dependente de voltagem; DAG = diacilglicerol; COX-2 = ciclooxigenase tipo 2; NO = óxido nítrico; eNOS = NO sintase endotelial; iNOS = NO sintase induzida; G-proteins = proteína G heteromérica; HSP27 e HSP70 = proteínas de choque térmico de 27 e de 70 kDa; IP3 = inositol trifosfato; IP3R = receptor de IP3; K = canais de  $K_{ATP}$  sarcolemais e mitocondriais; MnSOD = manganês superóxido dismutase (isoforma mitocondrial); NF- $\kappa$ B = fator nuclear- $\kappa$ B; PIP2 = fosfatidil inositol bifosfato; PKC = proteína cinase C; PLC/PLD = fosfolipases C e D; ROS = espécies reativas de oxigênio; RyR = canal de rianodina; SERCA2 = bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; SR = retículo sarcoplasmático (adaptado de Zaugg et al, 2003).

### 1.3.1 Papel do Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) na cardioproteção

O HIF-1 é composto por duas subunidades, HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , expressos constitutivamente na maioria dos tecidos de humanos e de roedores. A quantidade de HIF-1 $\alpha$  expressa no tecido é que determina a atividade do HIF-1. Em condições de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  pára de ser hidroxilado, ubiquitinado e degradado. A estabilização desta proteína permite sua dimerização com a subunidade HIF-1 $\beta$ , que não é sensível a concentração de oxigênio, culminando no aumento da atividade do HIF-1. Com isto, genes que contém um ou mais sítios de ligação para o HIF-1 tem a expressão estimulada. Genes como os da eritropoetina, NOS induzida, fator de

crescimento vascular endotelial (VEGF), heme oxigenase 1, receptor  $\alpha$ -adrenérgico, endotelina, transportadores de glicose 1 e 3, hexocinase 1 e 2; fosfofrutocinase, lactato desidrogenase e a adenilato cinase tem a transcrição estimulada pelo HIF-1 (Semenza, 2000a; Semenza, 2000b; Wenger, 2002).

Muitos dos genes regulados pelo HIF-1 promovem a expressão de proteínas ligadas a mecanismos protetores da segunda janela do PC isquêmico, instigando sobre a possível participação do HIF-1 nesse fenômeno. Tal envolvimento foi confirmado por Cai et al (2003), ao demonstrarem que camundongos com deficiência de expressão de HIF-1 $\alpha$  apresentavam maior área de infarto e menor recuperação da função contrátil cardíaca após o evento de isquemia reperfusão quando comparados a corações de animais selvagens também submetidos ao PC isquêmico. Posteriormente, em estudo feito com cloreto de cobalto (substância capaz de induzir respostas químicas semelhantes às encontradas na hipóxia) foi relatado proteção cardíaca as injúrias geradas pela I/R via ativação de HIF-1 $\alpha$ , ROS e proteína ativadora 1 (AP-1) (Xi et al, 2004). Além disso, a ativação permanente do HIF-1 via silenciamento do gene da prolil-4 hidroxilase-2 (responsável pela degradação do HIF-1 $\alpha$ ) de roedores resultou em maior tolerância cardíaca ao evento de I/R, mostrando o importante papel protetor desempenhado por esse fator (Natarjan et al, 2006).

#### 1.4. O EXERCÍCIO COMO TERAPIA CARDIOPROTETORA

Vários pesquisadores têm demonstrado que a prática de atividade física, tanto moderada quanto intensa, promove alterações fisiológicas e estruturais em vários tecidos. Algumas delas seriam responsáveis pela diminuição da incidência e do risco de morte por doenças do sistema cardiovascular (Berlin & Colditz, 1990; Lee et al., 1995), melhora da qualidade de vida de indivíduos que apresentam quadros hipertensivos (Paroo et al., 2002) e por restaurar a contratilidade de miócitos de ratos que sofreram infarto do miocárdio (Zhang et al., 2000).

O papel protetor do exercício pode ser desencadeado por mecanismos tanto agudos (promovidos por uma única sessão de exercício) quanto crônicos (cuja proteção persiste por mais tempo e envolve alterações metabólicas, enzimáticas e iônicas). Apesar de não estar totalmente compreendido, os dados da literatura

apontam para um fenômeno multifatorial que culmina em diferentes graus de proteção, dependentes do tipo, da duração, da intensidade da atividade e do sexo do animal (Taylor et al., 1999; Hamilton et al., 2001; Powers et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Paroo et al., 2002; Carson & Korzick, 2003; Hamilton et al., 2003; Korzick, 2003; Powers, 2003; Thorp et al., 2007). Dentre os mecanismos encontrados no estado da arte, destacamos:

. Melhora da circulação colateral – aumento da vascularização, minimizando a área isquêmica efetiva durante a oclusão de uma artéria (McElroy et al., 1978; Powers, 2003).

. Indução da expressão de HSP – Previne a agregação de proteínas em condições de estresse e restaura a atividade de enzimas como a citrato sintase, no momento da remoção do estresse através de reparo das estruturas injuriadas. Promove a degradação das proteínas anormais, inibe a apoptose, aumenta a síntese de NO e protege o citoesqueleto (Benjamin & McMillan, 1998; Latchman, 2001).

. Melhora da capacidade antioxidante tecidual – o aumento da expressão e da atividade de enzimas como a cobre-zinco superóxido dismutase, isoforma citossólica (CuZn-SOD); a manganês superóxido dismutase, isoforma mitocondrial (Mn-SOD); a catalase e a glutathione peroxidase. Essas enzimas agem na prevenção da lesão oxidativa nos lipídios, nas proteínas e no DNA, proveniente da grande produção de ROS encontrada nos episódios de I/R (Powers et al., 1993; Pereira, 1994; Hamilton et al., 2003).

. Indução da expressão de NOS<sub>i</sub> e NOS<sub>c</sub> – poderiam atuar na sinalização da PKC, ativando canais K<sub>ATP</sub>, além de induzirem a expressão de HSP70, que também está correlacionada com a cardioproteção (Rakhit et al., 1999).

#### 1.4.1. Exercício: Mecanismos Agudos de Cardioproteção

Sabe-se que pacientes com angina (dor no peito resultante de isquemia transitória do miocárdio) crônica apresentam menor tolerância ao exercício que indivíduos saudáveis. Foi mostrado que quando estes pacientes foram submetidos a duas sessões de exercício, sendo a segunda realizada 10 minutos após a primeira,

na segunda sessão foi encontrado aumento do limiar de isquemia e maior tolerância ao exercício. Porém, quando a segunda sessão foi realizada 24 horas após a primeira, tal achado não foi encontrado, sugerindo que o exercício estaria aumentando de forma temporária a tolerância cardíaca ao evento isquêmico (Tomai et al., 1999). Estes dados concordam com estudos feitos em animais, nos quais uma única sessão de exercício foi capaz de reduzir a área de infarto e melhorar a recuperação da função contrátil pós-isquemia (Taylor et al., 1999; Yamashita et al., 1999; Yamashita et al., 2001).

Taylor et al. (1999) mostraram que corações isolados submetidos à isquemia 24 horas após os animais terem sido submetidos a uma única sessão de exercício aeróbio apresentaram melhor recuperação da capacidade contrátil quando comparados a corações de ratos não submetidos ao exercício. Foi detectado aumento na expressão da HSP72, porém ela parece não ter sido a responsável pelo fenômeno, pois os animais submetidos ao exercício em ambiente frio apresentaram melhora da recuperação contrátil no período de reperfusão sem aumento significativo destas proteínas. Foi postulado que a cardioproteção poderia estar relacionada com a ativação da Mn-SOD, através da produção das ROS e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 induzidas pelo exercício (Yamashita et al., 1999).

No estudo de Yamashita et al (2001), uma única sessão de exercício foi capaz de aumentar a tolerância de corações isolados submetidos a isquemia 24 horas após o exercício. Nestes corações foi encontrado menor área de infarto e melhor fluxo coronário no final da reperfusão. Tal proteção foi abolida quando os ratos foram tratados com inibidor seletivo de PKC, sugerindo que a ativação desta via estaria ligada a cardioproteção induzida pelo exercício. Buscando compreender a distribuição subcelular e a fosforilação dessas proteínas, Carson & Korzick (2003) demonstraram que logo após o exercício os níveis da PKC $\beta$ 1 estavam diminuídos, enquanto os níveis da fosfo-PKC $\epsilon$ , da PKC $\alpha$  e da PKC $\delta$  se apresentavam aumentados com relação aos animais sedentários. Quando os níveis destas proteínas foram medidos 24 horas após o exercício, foi registrada diminuição de 31% da PKC $\delta$  e de 24% da PKC $\alpha$  em comparação ao grupo sacrificado logo após a atividade física. Isto sugere a participação da PKC no curso temporal dos diferentes graus de proteção promovidos por uma única sessão de exercício.

#### 1.4.2. Exercício: Mecanismos Crônicos de Cardiorroteção

Dentre os mecanismos crônicos de proteção parece que alguns deles são ativados com poucas sessões de exercício, como ativação das SOD (Demirel et al., 2001; Hamilton et al, 2001), enquanto outros precisam de mais sessões, como aumento da vascularização (McElroy et al., 1978; Powers, 2003). Além disso, também parecem ser influenciados pelo sexo do animal (Brown et al, 2005a; Throp et al, 2007; Chicco et al, 2007).

No que diz respeito às diferenças determinadas pelo sexo, Brown et al (2005a), relataram que fêmeas sedentárias apresentaram menor área de infarto e maior nível de SOD que machos. O exercício, apesar de não alterar a expressão de Mn-SOD, promoveu cardioproteção nos machos. Foi sugerido que o aumento da expressão do canal de  $K_{ATP}$  sarcolemal seria um dos mecanismos relacionados a maior proteção encontrada tanto no exercício (em ambos os sexos) quanto nas fêmeas. Throp et al (2007) mostraram que ratas fêmeas sedentárias e treinadas apresentavam valores similares de função contrátil durante a reperfusão. Em machos o mesmo não ocorreu: o efeito protetor foi observado somente no grupo treinado, gerando respostas contráteis semelhantes às encontradas nos grupos de fêmeas sedentárias e treinadas. Quanto aos mecanismos protetores, o conteúdo de Mn-SOD não diferiu entre os grupos e os níveis de HSP70 estavam aumentados somente nos grupos treinados. A NOSe apresentou diminuição no grupo de fêmeas treinadas com relação aos machos treinados, o que ainda não explicaria a proteção do grupo fêmea sedentária. Um possível mecanismo responsável por essa diferença e que corroboraria com achados anteriores foi relatado no trabalho de Chicco et al (2007), onde o bloqueio do canal de  $K_{ATP}$  sarcolemal fez com que a maior tolerância a eventos isquêmicos encontrados tanto no exercício quanto nas fêmeas sedentárias fossem abolidos.

Demirel et al. (2001) mostraram que ratos submetidos a três a cinco sessões de exercício apresentaram maior tolerância do tecido cardíaco a isquemia *in vivo*. Tal tolerância foi caracterizada por maior pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), taxa de encurtamento ( $dP/dt+$ ) e taxa de relaxamento muscular ( $dP/dt-$ ) durante a isquemia e a reperfusão. Nestes tecidos, foi encontrado aumento da atividade da MnSOD, dos níveis de glutathiona e da HSP72. Já no estudo de Hamilton et al. (2001) foi sugerido que o exercício promoveria cardioproteção em

ratos devido ao aumento das defesas antioxidantes deste tecido. Neste trabalho foi utilizado 1 hora de corrida (na intensidade de 70% VO<sub>2</sub> máximo) em temperatura de 25°C ou de 8°C durante três dias. Foi avaliada a tolerância do coração dos animais a isquemia regional (ligadura da artéria coronária descendente anterior) durante 20 minutos *in vivo*. Os resultados revelaram que os grupos exercitados mantiveram valores mais altos de PDVE, de dP/dt+ e de dP/dt- que os animais sedentários durante o período de isquemia e de reperfusão, além de maior atividade da MnSOD e menor peroxidação de lipídeos. Os níveis de HSP90, HSP72 e HSP40 foram maiores no grupo exercitado a 25°C, quando comparado ao sedentário e ao exercitado no frio (8°C), porém a cardioproteção foi similar nos grupos exercitados. Apesar deste resultado, vários pesquisadores têm investido no papel protetor desempenhado pelas HSP, principalmente as de 72kDa (Powers et al, 1998; Demirel et al, 2001; Powers et al., 2001; Hamilton et al., 2003), sugerindo que elas poderiam estar envolvidas na cardioproteção gerada pelo exercício, sem descartar, no entanto, a participação de outras vias e fatores atuando conjuntamente. Marini et al (2007), propuseram que os animais treinados apresentaram menor área de infarto, elevação nos níveis de heme oxigenase-1 (HSP32), ciclooxigenase-2, HSP70/72, diminuição da HSP60 e da proteína 75 regulada por glicose (GRP75), indicando que a cardioproteção seria um fenômeno multifatorial.

Avaliando os efeitos do treinamento com maior curso temporal (exercício intenso durante 10 semanas), Bowles et al. (1992) encontrou maior débito cardíaco, nível de ATP e fosfocreatina, além de melhor fluxo coronário pós-isquemia em corações isolados de ratos. Powers et al. (1993), mostraram incremento da atividade da SOD no VE de ratas submetidas a diferentes intensidades de exercícios aeróbios. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que animais treinados mantiveram um maior pico de pressão sistólica durante período de isquemia regional promovido pela oclusão da artéria coronária. Este maior pico de pressão estaria ocorrendo através da redução da peroxidação de lipídeos no VE dos ratos treinados, promovida pelo aumento da quantidade de tióis, de HSP72, da atividade da SOD, da PFK e da lactato desidrogenase (Powers et al., 1998). Dados semelhantes foram encontrados com 20 semanas de treinamento de *endurance*, utilizando modelo de isquemia regional. Os animais treinados exibiram menor área de infarto, melhor função mecânica do VE durante a isquemia e melhor fluxo coronário na área isquêmica durante a reperfusão, condizente com a maior atividade

das enzimas Mn-SOD e CuZn-SOD (Brown et al., 2003). Apesar de todos os trabalhos mostrando o importante papel desempenhado pelas enzimas antioxidantes, Lennon et al (2004) relataram que a prevenção do aumento da expressão da MnSOD (via nucleotídeos antisense), não alterou a proteção cardíaca induzida pelo exercício, sugerindo que essa via não seria essencial. Talvez, neste estudo, a proteção pudesse estar sendo compensada por outros mecanismos, tendo em vista o mosaico de alterações descritas até o momento.

Apesar de não ser o foco desta dissertação, é importante comentar sobre o papel de organelas celulares como a mitocôndria e o retículo sarcoplasmático (RS) na cardioproteção. Foram encontrados trabalhos nos quais a produção mitocondrial de ROS era inalterada (Marcil et al, 2006) ou reduzida (Starnes et al, 2007) em animais submetidos a exercício. O trabalho de Starnes et al (2007) sugere que a diminuição da produção de ROS na mitocôndria poderia explicar as menores lesões teciduais encontradas nos animais exercitados, mesmo quando estes não apresentam alterações nas defesas antioxidantes. Avaliando o impacto da inibição do canal de  $K_{ATP}$  na I/R, encontramos que os canais da mitocôndria não influíram na redução da área de infarto induzida pelo exercício, porém quando foi feito o mesmo com o canal de  $K_{ATP}$  sarcolemal a proteção foi totalmente abolida (Brown et al, 2005b). Outro mecanismo avaliado devido a sua importância foi o poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Marcil et al (2006) mostraram que o exercício foi capaz de reduzir a sensibilidade da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ao íon  $Ca^{2+}$ . Com isto, as quantidades de  $Ca^{2+}$  necessárias para abertura do poro foram mais altas, dificultando a abertura e a conseqüente morte celular encontrada na I/R.

Focando nos efeitos protetores vasculares, há relato de menor acúmulo de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático (RS) da musculatura lisa coronária de animais treinados. Esse achado contribuiria com a menor resposta contrátil a agonistas vasoativos encontrada no exercício, através da diminuição da liberação de  $Ca^{2+}$  e/ou aumento do tamponamento do influxo de  $Ca^{2+}$  do RS (Stehno-Bittel et al, 1990, 1991). Em outro estudo, o treinamento de endurance foi capaz de promover diminuição da vasoconstrição dos vasos coronários de resistência após a isquemia reperfusão *in vivo* em ratos. Este achado estaria relacionado à preservada função contrátil e endotelial do miocárdio (Symons et al., 2000) que seria desencadeada pela diminuição do pico intracelular de  $Ca^{2+}$  (promovida por agonistas como a

endotelina-1) reduzindo as lesões pós-isquêmicas induzidas por esse íon (Underwood et al., 1994; Bowles et al., 1995; Bowles & Wamhoff, 2003). O exercício também parece interferir no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L) gerado pela endotelina, aumentando-o, apesar dos níveis mais baixos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da menor resposta contrátil encontrados no músculo liso coronário. Os mecanismos que geraram esta resposta ainda não foram identificados, mas parecem ser independentes da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS ou do trocador  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal (Bowles & Wamhoff, 2003). Outro achado interessante foi que a menor resposta da musculatura lisa a endotelina seria dependente da ativação de canais de  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_{\text{v}}$ ). Tal fato foi confirmado por Jones et al. (1999), ao mostrarem que a menor resposta a endotelina nos animais treinados foi abolida pelo bloqueador não específico de canais de  $\text{K}^+$ .

#### 1.4.3. Outras Adaptações Fisiológicas ao Treinamento

Dentre as alterações promovidas pelo treinamento que seriam relevantes para este trabalho, encontramos hipertrofia do VE (De Maria et al., 1978; Trifunovic et al., 1995; Burelle et al, 2004) associado com aumento do diâmetro diastólico final do VE no exercício aeróbio (De Maria et al., 1978; Pelliccia et al, 1999), aumento do peso normalizado do coração e do  $\text{VO}_2$  máx, maior pico de pressão sistólica ventricular e magnitude da curva de Frank-Starling (Bowles et al., 1992). Também foi demonstrada melhora da função cardíaca e indução de  $\alpha$ -miosina de cadeia pesada em ratos após 13 semanas de exercício (Jin et al, 2000). O treinamento anaeróbio em humanos promoveu aumento da atividade glicolítica e oxidativa da musculatura exercitada (caracterizada pelo aumento da atividade das enzimas hexocinase, fosfofrutocinase, citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase). Além disso, o pico de força, o trabalho total em 30 segundos e o  $\text{VO}_{2\text{máx}}$  sofreram aumentos devido ao treinamento (Macdougall et al., 1998).

No que diz respeito ao peso corporal, as alterações dependem do tipo, da duração e do sexo do animal. No trabalho de Woodiwiss et al. (2000), animais submetidos ao exercício espontâneo por 13 semanas não apresentaram ganho de peso quando comparados aos animais controles (sedentários). Porém, em estudos que utilizaram protocolos em esteira ergométrica durante 20 semanas foi relatado

aumento do peso, através do ganho de massa magra (Jew & Moore, 2002; Brown et al., 2003). Em outros protocolos com duração de cerca de 10 semanas foi mostrada diminuição (Jin et al., 2000) ou manutenção do peso corporal (Bowles et al., 1992; Powers et al, 1998).

### 1.5. ESTERÓIDES ANABÓLICOS: ORIGEM E EFEITOS COLATERAIS

O isolamento da molécula de testosterona foi feito por Laqueur a partir de extratos testiculares em 1935. A síntese e caracterização deste hormônio ocorreram no mesmo ano por grupos de pesquisadores europeus (Bricout, 2000; Shahidi, 2001). Após a descoberta dos seus efeitos androgênicos, responsáveis pelo desenvolvimento do trato reprodutivo masculino e de características sexuais secundárias, e dos efeitos anabólicos, estimulando a fixação de nitrogênio e a síntese protéica, foi postulado o potencial terapêutico do componente anabólico da testosterona no tratamento de doenças com quadros de catabolismo. A partir deste momento começaram a ser desenvolvidas moléculas derivadas da testosterona, buscando-se isolar o efeito anabólico. Infelizmente, o máximo conseguido foram moléculas com maior efeito anabólico e reduzido androgênico (Shahidi, 2001).

A atividade anabólica dos derivados da testosterona (chamados posteriormente de esteróides anabólicos) foi manifestada primariamente pela ação miotrópica, resultando em aumento de massa e de força muscular. Associado a estes, também foram descritos efeitos androgênicos estimulatórios no cérebro, resultando freqüentemente em euforia e aumento da agressividade. Estes efeitos anabólicos e androgênicos estimulatórios levaram a difusão do uso não médico dos esteróides anabólicos (EA) por atletas de todos os níveis, assim como por usuários “recreativos” de drogas (Celotti & Negri, 1992; American Academy of Pediatrics, 1997; Shahidi, 2001).

Os relatos iniciais da utilização da testosterona por esportistas datam de 1950 (Bricout, 2000). Em 1977 e 1984 o uso alarmante de EA e os riscos médicos associados a este, foram assunto de reuniões do American College of Sports Medicine e em 1989 do American Academy of Pediatrics. A partir daí o uso dessas substâncias foi condenado, mesmo reconhecendo que poderiam aumentar a força muscular (Celotti & Negri, 1992). Posteriormente, como resposta

ao problema de manufatura clandestina e venda ilegal de EA, em 1990 o Congresso dos Estados Unidos aprovou uma legislação tornando os EA pertencentes à classe III de substâncias controladas, entrando esta em vigor em fevereiro de 1991 (Shahidi, 2001).

Os EA atuam em tecidos como o ósseo, adiposo, musculatura esquelética e cardíaca, próstata, cérebro, fígado e rins, desempenhando diferentes funções. Em vários tecidos, a testosterona age como um pró-hormônio, onde a 5 $\alpha$ -redutase citoplasmática o transforma na molécula ativa 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, que possui uma alta afinidade pelo seu receptor. Nos músculos cardíaco e esquelético, a própria testosterona se liga ao seu receptor, com grande afinidade, ativando-o. Esses hormônios podem se ligar a receptores presentes na membrana celular (mecanismo rápido, não genômico) ou atravessar a mesma, devido ao seu arcabouço lipossolúvel, atuando em receptores citoplasmáticos e/ou nucleares (mecanismo clássico, genômico) cujos efeitos e sinalização serão discutidos posteriormente (Brann et al., 1995; Bricout, 2000; Griffin, 2000; Schmidt et al., 2000; Shahidi, 2001).

#### 1.5.1. Efeitos não genômicos dos EA: alterações comportamentais

O estudo dos efeitos não genômicos no cérebro são importantes porque auxiliam na explicação das mudanças comportamentais encontradas em usuários de EA. Em cérebros de ratos, foi demonstrado que a injeção de testosterona promoveu alterações nas respostas neuronais como aumento da frequência de disparos de neurônios do hipotálamo lateral, hipotálamo anterior e núcleo septal. Em gatos, esta molécula não alterou a atividade cerebral, mas ao infundir androsterona ou androstanediol foi observada uma supressão da mesma. Os dados da literatura apontam para uma dependência da resposta neuronal em função da subpopulação de neurônios estudada (Brann et al., 1995).

As respostas agudas, cujos mecanismos acabamos de comentar, podem resultar em hiperatividade central noradrenérgica promovendo irritabilidade, ansiedade, insônia, mialgia, náusea, vômitos, taquicardia, hipertensão, piloereção, calores, suor, depressão e vontade de ingerir a droga (dependência) (Brann et al., 1995; Schmidt, 2000).

### 1.5.2. Efeitos Genômicos dos EA

Após o hormônio atravessar a membrana lipídica ele se liga ao seu receptor específico, formando um complexo que é transportado por difusão passiva para o núcleo, onde atua modulando a síntese de RNAm e conseqüentemente a de proteínas (Bricout, 2000).

Os efeitos anabólicos da testosterona e de seus derivados são mais observados na musculatura esquelética e cardíaca. No coração, freqüentemente promove uma hipertrofia, principalmente do ventrículo esquerdo (VE). As modificações na composição das células miocárdicas foram evidenciadas pelo aumento da dimensão dos miócitos, fragmentação miofibrilar e destruição focal dos discos intercalares. Também foram encontradas alterações das respostas hemodinâmicas, tais como perda da eficácia da bomba cardíaca e da função diastólica (Bricout, 2000). Foi relatada a diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em estudo feito com cães treinados tratados com esteróides anabólicos (EA) (Ramo et al., 1987). Apesar disto, Thompson et al. (1992) mostraram que levantadores de peso tratados com EA não apresentavam alterações de freqüência cardíaca, pressão arterial e dimensões cardíacas (diâmetro diastólico da cavidade ventricular esquerda, espessura septal, espessura da parede posterior e massa do miocárdio). No músculo esquelético, o ganho de massa parece ocorrer através do aumento do arcaibouço protéico dos elementos sarcoplasmáticos. Um ponto que é importante a se ressaltar, é que essas alterações dependem de uma combinação de tratamento, exercício (principalmente os de força) e dieta hiperprotéica (Bricout, 2000).

1.5.3. Superdosagem de EA: melhora do desempenho e da beleza física versus a perda silenciosa da saúde do corpo

O uso indiscriminado e acima das doses terapêuticas de esteróides anabólicos tais como o decanoato de nandrolona, oxandrolona, oximetolona e stanozolol tem sido utilizado por atletas, buscando melhora da performance, e por praticantes de atividade física, almejando perda de peso ou ganho de massa muscular com menor tempo e esforço tem sido foco de muitos estudos (American

and Academy of Pediatrics, 1997). As doses utilizadas variam entre as recomendadas com fins terapêuticos até valores de 10 a 200 vezes superiores a elas (Burkett & Falduto, 1984; American Academy of Pediatrics, 1997).

Desde que os anabolizantes foram sintetizados, múltiplos trabalhos foram feitos, sendo seus resultados muitas vezes antagônicos. Alguns reportaram que estas drogas não geravam ganho de força ou de massa muscular tanto em animais quanto em homens jovens e saudáveis (Trifunovic et al., 1995; Phillis et al., 2000). Porém, também foram encontrados relatos de caso e estudos com animais apontando para um incremento na massa muscular utilizando-se doses suprafarmacológicas de EA (Cowan & Kicman, 1997; Wodiwiss et al, 2000).

Múltiplos efeitos colaterais foram relatados com a superdosagem de EA. Dependendo da dosagem, do indivíduo e do tempo de tratamento, as alterações podem ser irreversíveis e podem afetar diferentes tecidos (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Hughes et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; Ferrández et al., 1996; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Gazvani et al., 1997; Wu, 1997; Bricout, 2000; Petersen & Hoffman-Goetz, 2000; Shahidi, 2001). No sistema cardiovascular foi reportado aumento do colesterol; diminuição do HDL-C (colesterol de alta densidade), devido à supressão da atividade da lipase endotelial hepática; aumento do LDL-C (colesterol de baixa densidade) e da agregação plaquetária; trombose; cardiomiopatias; infartos do miocárdio; acidentes vasculares cerebrais e embolia pulmonar (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Wu, 1997; Bricout, 2000; Shahidi, 2001).

No sistema reprodutor, em homens, houve casos de diminuição dos níveis de hormônio luteinizante e folículo estimulante, acarretando na diminuição da produção endógena de testosterona. Também foi relatado diminuição da espermatogênese e atrofia testicular, infertilidade, oligo ou azoospermia, impotência, hipertrofia da próstata, carcinoma prostático e ginecomastia. Em mulheres foram encontrados casos de amenorréia e infertilidade, devido à supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal, atrofia uterina, aumento do clitóris, atrofia dos seios, teratogenicidade, virilização e engrossamento da voz. Em crianças pode ocorrer o fechamento prematuro das epífises ósseas, aumento da taxa de rupturas e lesões musculares, além de retardo do crescimento linear (Gazvani et al., 1997; Wu, 1997; Shahidi, 2001). Outros achados comuns são a

hiperceborréia, a acne (devido à infecção dos canais e das glândulas sebáceas), o edema, o crescimento de pêlos no corpo e na face, a calvície e o tumor de Wilm no aparelho urinário (Wu, 1997; Shahidi, 2001).

No fígado, houve relatos de lesões celulares, tumores benignos e malignos, hepatoadenomas, hepatocarcinomas, aumento nos níveis de enzimas como a lactato desidrogenase, a aspartato aminotransferase e a alanina aminotransferase e peliose hepática (patologia caracterizada por múltiplos pequenos cistos hemorrágicos distribuídos randomicamente pelo parênquima do fígado) (American and Academy of Pediatrics, 1997; Wu, 1997; Shahidi, 2001). Também foram descritos quadros de diminuição da tolerância à glicose e imunossupressão (caracterizada pela diminuição dos níveis de IgA, IgM e IgG, além de prejuízo na mobilização de linfócitos). Outro achado comum foi a hepatite B ou C e o HIV, devido ao freqüente uso compartilhado de seringas (Hughes et al., 1995; Ferrández et al., 1996; Wu, 1997; Petersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Em estudos comportamentais foram encontrados casos de irritabilidade, aumento da agressividade, euforia, depressão, aumento da libido, psicose, vício, dependência e mudanças de humor (Wu, 1997; Shahidi, 2001).

#### 1.5.4. Decanoato de Nandrolona (DECA): síntese e metabolização

O EA nandrolona foi sintetizado entre 1950 e 1953. Surgiu a partir da substituição do átomo de hidrogênio no grupamento metil do carbono 19 da testosterona, criando um novo centro assimétrico no carbono 10, responsável pela maior taxa anabólica e menor androgênica da droga (figura 7). Seus principais metabólicos são a 3-norandrosterona, um  $5\alpha$ -derivado e a 2-noreticholanolona, um  $5\beta$ -derivado. Estudos *in vivo* mostraram que a nandrolona também pode ser convertida a estradiol, mas sua aromatização é apenas 20% da encontrada com a testosterona (Shahidi, 2001).

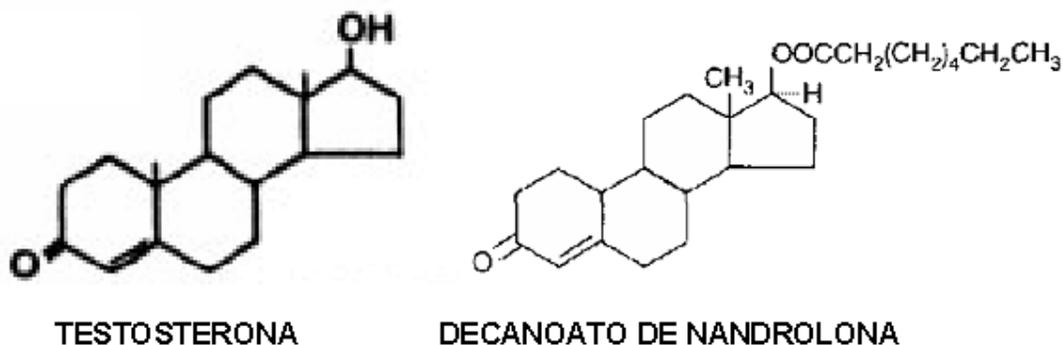


Figura 7: Estrutura de molécula da testosterona (esquerda) e do seu análogo, decanoato de nandrolona – DECA (direita) (adaptado de Shahidi, 2001).

### 1.6. EXERCÍCIO E ANABOLIZANTES: A SAÚDE VERSUS A DOENÇA

Os benefícios dos EA em atletas ainda são motivo de controvérsias. Phillis et al. (2000) mostraram que o tratamento com DECA durante 15 dias na dose de 20mg/Kg/semana não foi suficiente para promover hipertrofia ou alterar a atividade elétrica ou a função ventricular de corações de ratos. Já Trifunovic et al. (1995), utilizando tratamento com DECA na dose de 5mg/Kg, 2 vezes por semana em ratos, encontrou aumento do peso normalizado do coração, redução do peso corporal, do peso absoluto do coração e da concentração plasmática de testosterona. Também foi constatado que os ratos tratados com DECA apresentaram diminuição da complacência e da performance cardíaca. Apesar disso, outros trabalhos mostraram melhora da performance atlética, caracterizada pelo aumento de força e de massa muscular esquelética e cardíaca, com o uso de doses suprafisiológicas de vários EA (Karhunen et al., 1988; Griggs et al., 1989; Bhasin et al., 1996; Cowan & Kicman, 1997; Sullivan et al., 1998), além de maior tolerância ao exercício de levantamento de peso (Tamaki et al., 2001). Tal tolerância também foi reportada aos exercícios de alta intensidade e pode estar ligada ao aumento dos níveis de HSP72, encontrada nos músculos de contração rápida, mas não nos de contração lenta, em ratos treinados tratados com doses suprafisiológicas de DECA (González et al., 2000). Também foi relatado aumento da capacidade aeróbia em exercícios de endurance com o uso de EA, porém os mecanismos responsáveis por essa melhora não foram comentados (Lamb, 1989).

O tratamento com DECA na dose de 3,75mg/Kg promoveu um aumento na tolerância ao exercício com peso, em ratos Wistar. Foi encontrada maior resistência à fadiga e capacidade de exercer trabalho (intensidade de exercício), além da melhor taxa de síntese protéica durante a recuperação e menor lesão muscular após sessão de levantamento de peso nos ratos tratados (Tamaki et al., 2001). Woodiwiss et al (2000) demonstraram que ratos treinados tratados com doses de 10mg/Kg de DECA apresentaram hipertrofia patológica do miocárdio (caracterizada por maior diâmetro do VE em pressões de 0mmHg) quando comparado aos treinados controle e aos sedentários controle e DECA, porém menor espessura relativa do VE quando comparados aos animais treinados controles em pressões diastólicas finais fisiológicas (valores entre 0-8mmHg). Também foi encontrada menor complacência do VE, não relacionada à quantidade ou ao tipo de colágeno da câmara no grupo sedentário com DECA.

O uso de EA foi correlacionado com a incidência de mortes súbitas e infartos do miocárdio em atletas e em praticantes eventuais de atividade física. Dentre as alterações relatadas que poderiam explicar tanto a morte súbita quanto o infarto encontramos alterações elétricas na repolarização, avaliadas indiretamente através da medição do intervalo e da dispersão do QT do ECG, aterosclerose, formação de trombos, vasoespasmos provenientes de alteração no sistema do NO e lesões diretas nas células miocárdicas (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Wu, 1997; Stolt et al., 1999; Bricout, 2000; Shahidi, 2001; Halvorsen et al, 2004). Além disso, Du Toit et al (2005), mostraram que doses suprafisiológicas de DECA aumentaram a susceptibilidade do miocárdio a lesões advindas de insultos de I/R. A maior lesão isquêmica estaria relacionada a aumentos do AMPc, estimulando a sobrecarga de  $Ca^{2+}$  celular, e do TNF- $\alpha$  encontrados nos animais tratados com anabolizante.

Apesar de haverem vários estudos demonstrando os diversos efeitos deletérios do uso de altas doses de EA sobre o sistema cardiovascular, só encontramos dois trabalhos bem recentes avaliando as implicações decorrentes da associação dessas drogas com o exercício quando o coração é submetido ao insulto de I/R (Du Toit et al, 2005; Chaves et al, 2006 - ANEXO 1), ressaltando a necessidade de mais trabalhos investigando este assunto.

## 2 OBJETIVOS

Devido à pequena quantidade de dados na literatura focando os efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre as injúrias isquêmicas em corações isolados, os objetivos do presente estudo foram:

- . Avaliar a atividade elétrica e contrátil dos corações dos animais submetidos ao exercício associado ou não ao tratamento com doses suprafisiológicas de DECA;
- . Elucidar os efeitos do exercício e do tratamento com doses suprafisiológicas do DECA sobre o insulto de isquemia/reperfusão (I/R), através da função contrátil e área de infarto.
- . Investigar o comportamento das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (tióis) durante a I/R em animais treinados tratados ou não com DECA.
- . Avaliar o comportamento do metabolismo energético durante a I/R através de algumas enzimas-chaves, como a hexocinase e a atividade do complexo I-III mitocondrial.
- . Averiguar, indiretamente:
  - o conteúdo de atividade mitocondrial através da atividade da enzima citrato sintase
  - o envolvimento do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) nas alterações promovidas pelo exercício e pelo tratamento com DECA durante a I/R. Para tal foram avaliadas as atividades de algumas enzimas reguladas por este fator, tais como a lactato desidrogenase e a hexocinase.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho pode ser dividido em duas partes. Na primeira parte, investigamos os efeitos do treinamento e do tratamento com DECA no ECG *in vivo* e na isquemia-reperfusão (I/R) *in vitro*, avaliando a função contrátil e a área de infarto. Também foram realizadas diversas análises enzimáticas no coração dos animais dos quatro grupos experimentais, numa situação normal, ou seja, sem terem sido expostos ao procedimento de I/R *in vitro* (conforme descrito posteriormente). Os dados de contratilidade durante a I/R, área de infarto e atividade controle das enzimas antioxidantes deram origem ao artigo publicado no *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, que se encontra em anexo. Na segunda parte do trabalho, foram investigados os efeitos da I/R na atividade de várias enzimas, dentre elas as enzimas antioxidantes (como descrito no tópico de análises espectrofotométricas).

O número de animais utilizados em cada grupo experimental está descrito na seção de resultados. Os grupos experimentais foram realizados em diferentes períodos desta tese, sendo os tecidos de todos os quatro grupos experimentais coletados e analisados em no mínimo três dias diferentes visando averiguar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

#### 3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso inicial entre 150 e 180g, com idade aproximada de dois meses. Inicialmente, todos os animais foram colocados em uma esteira ergométrica adaptada para ratos (figura 8) e deixados cerca de 5 minutos para ambientação. Após este período, a esteira foi ligada na velocidade de 5 m/min estimulando a caminhada dos animais, promovendo um leve aquecimento (10 à 15 minutos). Posteriormente, foram feitos incrementos súbitos da velocidade da esteira (“tiros”), durante 30 a 60 segundos, até que fosse alcançada a velocidade máxima de corrida dos ratos. Entre um “tiro” e outro os animais permaneciam caminhando na esteira (5 m/min) de modo a permitir uma recuperação ativa (ou seja, permanecendo em atividade leve) para o “tiro” seguinte. Vale a pena ressaltar que o intervalo máximo entre os tiros foi de 3 minutos. Os ratos que atingiram

velocidade máxima do teste inferior a 25 m/min ou se recusaram a correr foram excluídos dos grupos experimentais (tanto os sedentários quanto os treinados).



Figura 8: Esteira ergométrica utilizada para o treinamento dos ratos. Observe que cada animal corre em uma baía. A partir da 7ª semana de treinamento, foi utilizada uma inclinação de 5 a 10%, conforme o protocolo descrito a seguir.

### 3.2. TREINAMENTO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

No momento em que os ratos atingiram aproximadamente 200g de peso iniciamos o período experimental, com duração de dez semanas. O estudo foi composto por quatro grupos: sedentário controle – SC (tratado com veículo), sedentário tratado com o anabolizante DECA – SD, treinado controle – TC (tratado com veículo) e treinado tratado com DECA – TD.

Os animais treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento intervalado (um exercício intenso solicitando uma grande demanda energética via metabolismo glicolítico, devido à alta velocidade de corrida – a maior que os ratos foram capazes de tolerar). O exercício foi adaptado em nosso laboratório (devido à escassez de detalhamentos nos protocolos desta natureza na literatura), a partir do protocolo descrito por Muniz et al, 2001. O objetivo ao utilizar um protocolo intervalado foi averiguar se o mesmo seria capaz de promover cardioproteção semelhante à descrita nos protocolos de exercício de *endurance* (onde os animais

correm numa velocidade menor durante mais tempo, neste tipo de exercício a via energética mais solicitada é a aeróbia). No nosso protocolo de exercício, os ratos correram cinco vezes por semana durante dez semanas como descrito abaixo (figura 9):

. **1ª semana:** Período de adaptação: Nos três primeiros dias os ratos caminhavam na velocidade de 5-6 m/min durante 20-30 min. Nos dois dias subseqüentes os animais aqueciam durante 15 min (5-6 m/min), realizavam três “tiros” de 30 segundos na velocidade de 15-20 m/min com recuperação ativa (ou seja, caminhando) na velocidade de 5 m/min durante 2,5 min. Ao término dos três “tiros”, os animais retornavam à velocidade de aquecimento (5-6 m/min) durante 5-10 min.

. **2ª a 4ª semana:** Incremento no número de “tiros” (totalizando seis) e da velocidade (variando entre 15-22 m/min na segunda semana até 20-25 m/min na quarta semana). Diminuição do tempo de recuperação, passando para 2 minutos.

. **5ª a 6ª semana:** Incremento na velocidade dos “tiros”, terminando o final da sexta semana entre 25-31 m/min. Diminuição do tempo de recuperação na sexta semana para 1,5 min.

. **7ª a 8ª semana:** Manutenção do número e da velocidade dos “tiros”. Aumento de cinco por cento da inclinação da esteira em cada semana. Diminuição do tempo de recuperação na oitava semana para 1 min.

. **9ª a 10ª semana:** Manutenção da carga de exercício, sendo composto por seis “tiros” na velocidade de 26-31 m/min, tempo de recuperação ativa de 1 min com uma inclinação de 10% da esteira. A velocidade do aquecimento, de recuperação ativa e de retorno ao repouso, no final do exercício, oscilou entre 7-10 m/min a partir da segunda semana.

Os ratos dos grupos sedentários permaneceram em suas respectivas caixas durante todo o período experimental, ficando com atividade restrita àquele ambiente. Estes animais sofreram manipulação diária dos responsáveis pelo treinamento do grupo treinado, minimizando o estresse gerado pela manipulação dos diferentes grupos. No início do protocolo experimental (antes dos animais começarem o treinamento) e na última semana (após o último dia de treinamento), foi realizado um eletrocardiograma em todos os animais. Na terceira semana de período experimental, foi iniciado o tratamento com decanoato de nandrolona (DECA) (Organon – Brasil), na dose de 10 mg/kg, ou veículo (óleo de amendoim com 10% de álcool benzílico), através de injeções intramusculares, mais precisamente na

musculatura das patas traseiras, uma vez por semana. O volume de veículo injetado nos animais controles era proporcional ao injetado nos animais tratados com DECA.

S2-S4 = Aumento tiros (3 para 6 x 30'') e da velocidade (15-22 para 20-25 m/min)

S7-S8 = Aumento da inclinação (5% - 7ª semana, 10% 8ª semana). Manutenção da velocidade

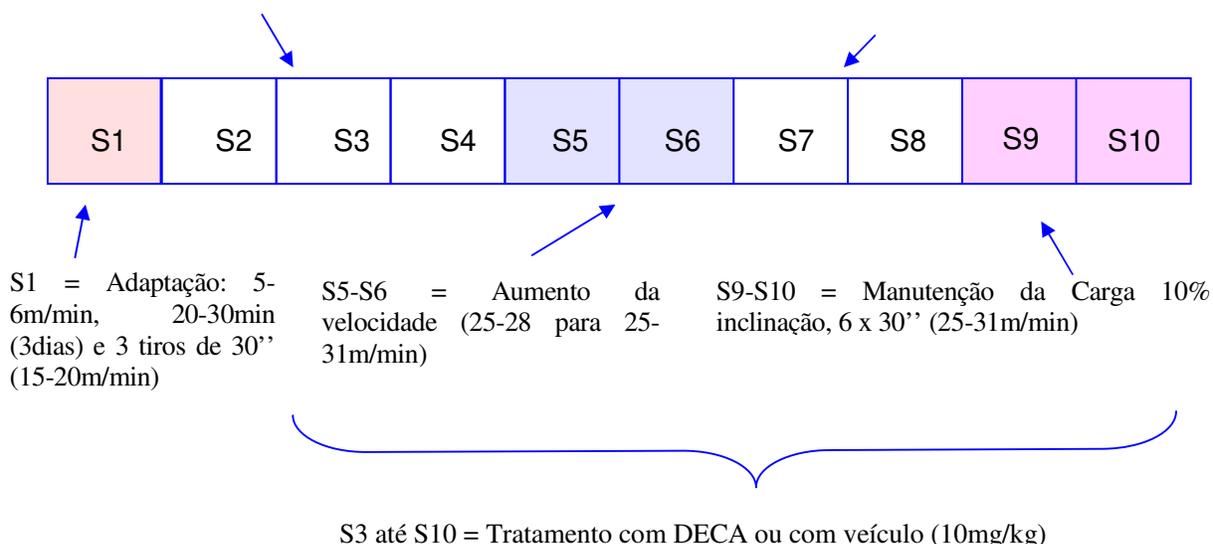


Figura 9: Esquema ilustrando o protocolo experimental de dez semanas. O treinamento teve duração de dez semanas e o tratamento de oito semanas. Os animais sedentários permanecem confinados dentro das respectivas caixas, sendo submetidos somente ao tratamento com veículo ou anabolizante. S1 a S10 = semana 1 a semana 10

### 3.3. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) *IN VIVO*

O ECG é um registro extracelular da atividade elétrica do coração. Ele é formado por vários segmentos, compostos por "ondas", representando os eventos de despolarização e repolarização do tecido (figura 10). A onda P representa a despolarização atrial, o QRS a despolarização ventricular e a onda T a repolarização ventricular. A repolarização atrial não consegue ser avaliada no ECG, pois a mesma ocorre no mesmo momento temporal do registro da despolarização ventricular, como os ventrículos possuem massa muscular muito maior que a atrial, tal registro encontra-se sucumbido pelo complexo QRS. A medida do intervalo PR reflete o tempo necessário para que a despolarização atrial atinja o tecido ventricular, despolarizando-o. Alterações nas medidas do PR, medido do início da onda P até o início do complexo QRS, refletem problemas no sistema de condução ou no nódulo átrio-ventricular, caracterizando um distúrbio elétrico conhecido como bloqueio átrio-

ventricular. O intervalo QT ilustra o tempo despendido no evento elétrico de despolarização e repolarização dos ventrículos. Foi medido do início do complexo QRS até o final da onda T, caracterizado por uma tangente traçada na fase descendente da onda T até o momento que esta cruzava a linha isoeletrica (basal) do ECG (Stolt et al., 1999).

Ao término da décima semana (fim do período experimental), os animais foram mantidos anestesiados com éter etílico PA (Merck) e fixados em uma mesa cirúrgica onde foram inseridos eletrodos subcutâneos visando a aquisição do ECG. Os eletrodos, positivo, negativo e referência (ground), estavam conectados à entrada negativa de um amplificador diferencial (ML136 Bio Amplifier – ADInstruments, Nova Zelândia). A saída do amplificador estava conectada a um dos canais de entrada de uma placa conversora analógico-digital (AD Interface PowerLab/400 – ADInstruments - Nova Zelândia), para aquisição digital do sinal de ECG. Foram registradas as derivações DI, DII e DIII do ECG de cada animal, visando a subsequente análise da frequência cardíaca (FC), dos intervalos PR, QT e QT corrigido (através da fórmula  $QT_c = QT \text{ (ms)} / \sqrt{RR \text{ (seg)}}$ , segundo Illamo et al., 2002) e do eixo elétrico (Novosel et al., 1999). A análise dos registros de ECG foi feita no modo de operação “off line”, através do programa PowerLab Chart4 for Windows (ADInstruments - Nova Zelândia).

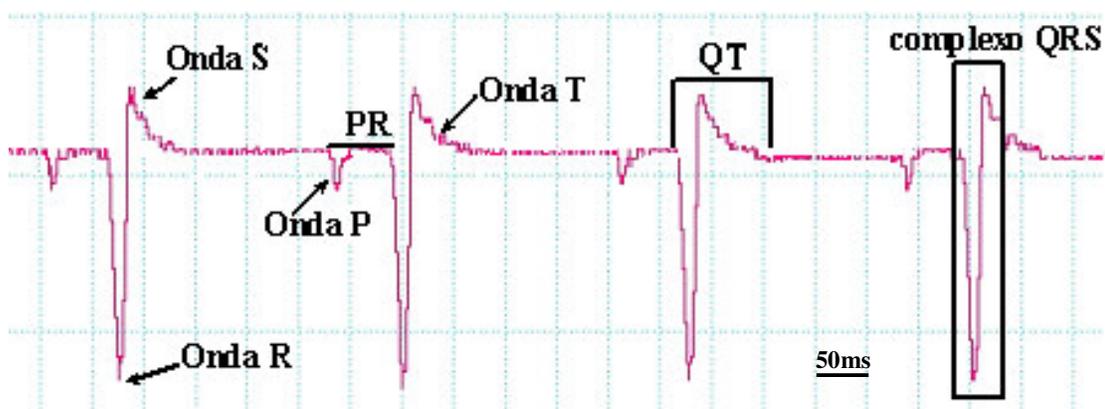


Figura 10: Traçado ilustrando um registro de eletrocardiograma (ECG) de coração isolado de rato e de como foram avaliadas as medidas dos intervalos PR e QT, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. O intervalo PR foi mensurado do início da onda P até o início do complexo QRS. O intervalo QT foi medido do início do complexo QRS até o final da onda T, caracterizado por uma tangente traçada na fase descendente da onda T até o momento que essa tangente cruzava a linha isoeletrica (basal) do ECG.

### 3.4. EXPERIMENTOS COM CORAÇÃO ISOLADO

Após o período de treinamento e tratamento os ratos foram pesados, anestesiados com éter (dietil éter PA) e posteriormente sacrificados através de deslocamento cervical. O tórax foi aberto, o coração rapidamente removido e sua artéria aorta canulada em uma montagem de coração isolado (figura 10) (Locke & Rosenheim, 1907). Posteriormente, o pulmão, fígado, testículos, *gastrocnemio*, rins com supra renais e a gordura retro peritoneal foram retirados e pesados de modo a avaliar possíveis alterações de retenção hídrica e no conteúdo de tecido adiposo geradas pelo tratamento com DECA.

A função do miocárdio isolado foi mantida íntegra através do fluxo constante da solução de Krebs modificada (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, Glicose 11 mM, e CaCl<sub>2</sub> 1 mM) gerado por uma bomba peristáltica (10 mL/min) na temperatura de 37° C, através de um banho circulante. A solução utilizada na perfusão do tecido foi submetida à aeração durante todo o experimento com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Um balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo através de um pequeno corte na intercessão do átrio com o ventrículo esquerdo, visando a medida da pressão desenvolvida por esta câmara. O balão estava acoplado a um transdutor de pressão (MLT0380 BP transducer, ADInstruments), conectado a um amplificador de sinal (ML110/D Bridge Amplifier – ADInstruments) ligado a uma placa conversora analógico-digital (A/D Interface PowerLab/400 – ADInstruments) que permitia a visualização do registro da pressão intraventricular no computador.

O coração foi mantido submerso em uma cuba de vidro contendo solução de Krebs aquecida a 37° C. Três eletrodos, constituídos por fio de prata cloretado no interior de tubos de vidro repletos de solução de NaCl 1 M, foram posicionados no interior da cuba para registro do eletrocardiograma (ECG). Um eletrodo posicionado próximo à superfície epicardial do átrio direito (AD) foi conectado à entrada negativa de um amplificador diferencial (ML136 Bio Amplifier - ADInstruments). O segundo eletrodo posicionado próximo ao ápice do ventrículo esquerdo foi conectado à entrada positiva do amplificador. O terceiro eletrodo, posicionado equidistante dos dois primeiros, foi conectado à entrada de referência (ground) do amplificador. A saída do amplificador estava conectada a um dos canais de entrada de uma placa

conversora analógico-digital (AD Interface PowerLab/400 – ADInstruments), para aquisição digital do sinal de ECG (figura 11).

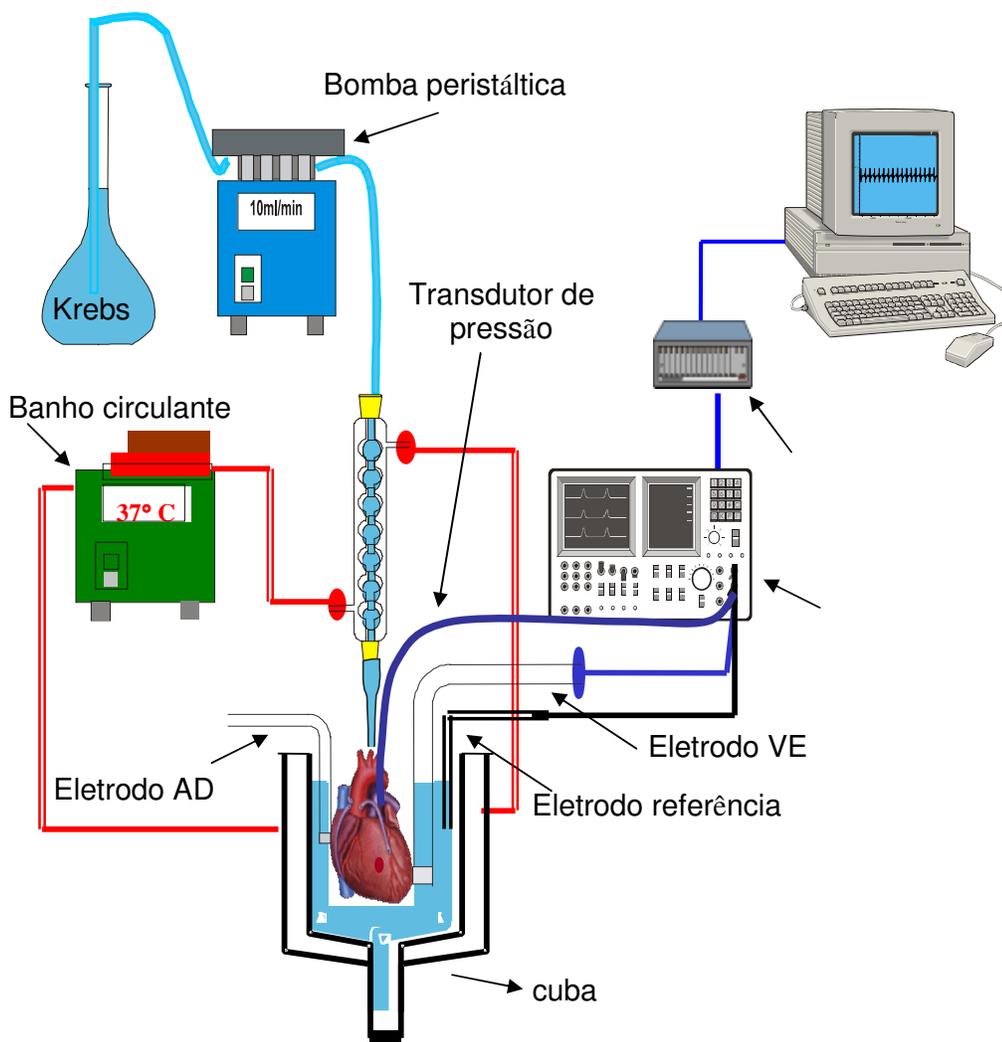


Figura 11: Esquema ilustrando a montagem de coração isolado (Langendorff). O fluxo de Krebs para o coração foi mantido em 10 mL/min através de uma bomba peristáltica e a temperatura em 37°C por um banho circulante. O coração teve um balão de látex inserido no ventrículo esquerdo (VE), visando o monitoramento da pressão desenvolvida por esta câmara. O órgão foi mantido submerso em uma cuba de vidro, repleto de Krebs aquecido, onde foram posicionados eletrodos de vidro repletos de NaCl 1M. Um eletrodo foi posicionado próximo ao átrio direito, o segundo ao ventrículo esquerdo e o terceiro na parede da cuba de vidro, servindo de terra.

A análise dos registros de ECG e pressão foram feitos no modo de operação “off line” do programa PowerLab Chart4 for Windows (ADInstruments). A interpretação do ECG do coração isolado foi feita da mesma forma que a do ECG *in vivo* (observando os parâmetros FC, intervalo PR e QT). No registro de pressão foi

avaliada a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), caracterizada pela diferença de amplitude do registro de pressão do VE, durante todo o protocolo experimental. Estes dados foram normalizados pelos respectivos valores de controle de cada experimento, de modo que obtivemos valores em porcentagem da pressão desenvolvida (%PDVE) com relação ao controle, avaliando desta forma a função contrátil do miocárdio durante o episódio de isquemia/reperfusão. No período controle foi avaliada a primeira derivada da pressão desenvolvida pelo VE ( $dP/dt$ ). Este parâmetro nos forneceu valores relativos ao índice de contratilidade ( $dP/dt+$ ) e de relaxamento ( $dP/dt-$ ). O  $dP/dt+$  é um parâmetro que correlaciona a contração muscular (em mmHg) com o tempo gasto no evento de contração (em segundos), enquanto a  $dP/dt-$  com o relaxamento, ou seja, quanto maior o valor da  $dP/dt+$ , melhor a função contrátil e quanto maior o valor absoluto da  $dP/dt-$ , melhor o relaxamento do miocárdio ventricular.

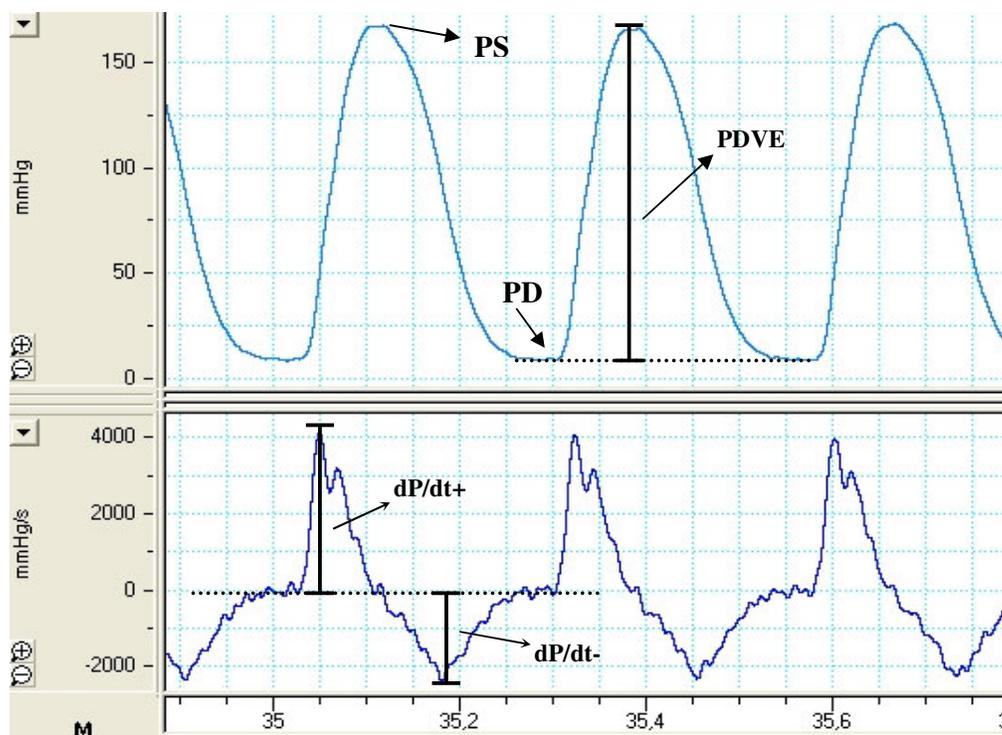


Figura 12: Registro da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e da  $dP/dt$ . A PVDE foi mensurada pela diferença de amplitude do registro de pressão do VE obtido entre o final da sístole (pressão sistólica – PS) e o da diástole (pressão diastólica – PD), como ilustrado no registro de pressão. A primeira derivada da pressão desenvolvida ( $dP/dt$ ), nos forneceu valores relativos à função contrátil ( $dP/dt+$ ) e de relaxamento ( $dP/dt-$ ). A  $dP/dt+$  foi medida através da diferença entre o pico positivo da  $dP/dt$  e o valor da linha de base. Já a  $dP/dt-$  pela diferença entre o pico negativo e o valor da linha de base, como ilustrado na figura.

O protocolo experimental de isquemia-reperfusão consistiu de um período controle, onde a solução de Krebs perfundi todo o tecido cardíaco, seguido de 30 minutos de isquemia global com 60 minutos de reperfusão como segue:

- . Controle – duração de 30 – 60 minutos. Pressão diastólica fixada em aproximadamente 10mmHg. Estabilização dos parâmetros medidos (frequência cardíaca, intervalo PR, pressão desenvolvida pelo VE).
- . Isquemia - 30 minutos de isquemia global do coração, onde o fluxo foi totalmente interrompido pelo desligamento da bomba peristáltica.
- . Reperfusão – o fluxo de Krebs foi retomado ao órgão, ligando novamente a bomba peristáltica durante 60 minutos.

### 3.5. AVALIAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO

Para determinação da área de infarto, após os 60 minutos de reperfusão, o coração foi pesado e fatiado em cortes de aproximadamente 1,5mm. As fatias foram imersas durante 4 min, a 37° C, em uma solução de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) diluído a 1% (p/v) em tampão fosfato (pH 7,4) (Stofer, 1964). O TTC é um corante que possui a propriedade de atravessar membranas lipídicas, corando os tecidos viáveis. Nestes tecidos, o TTC é reduzido por enzimas desidrogenases e diaforases através da oxidação do NADH ou do NADPH, formando um pigmento vermelho formazan. Na área infartada, a inatividade ou ausência dessas enzimas e cofatores (NADH e NADPH) impossibilita a marcação do tecido pelo corante. Deste modo, a área com coloração amarelo pálido representa a área infartada e a vermelha a viável (Stofer, 1964; Ito et al., 1997).

Após coloração com TTC, os cortes foram imersos em solução de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 10% de formalina (p/v) durante 24 horas. As imagens das fatias coradas foram digitalizadas através de um scanner. Posteriormente foi feita uma planimetria, utilizando o programa de análise de imagens ImageJ (NIH ImageJ: National Institute of Health, USA, versão 1:22 - obtido livremente na Internet), para determinação do tamanho da área infartada. A área de infarto foi expressa como porcentagem da área total de cada coração.

### 3.6. ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Na primeira parte do trabalho (dados publicados no artigo em anexo), os animais oriundos dos quatro grupos experimentais foram sacrificados, os corações lavados em solução de Krebs para retirada do sangue e de coágulos e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento onde foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes. Na segunda parte do trabalho, os corações foram canulados na montagem de Langendorff (figura 11) e submetidos ao protocolo de I/R (conforme descrito no tópico de coração isolado, porém sem que os eletrodos fossem imersos no banho e o balão de látex inserido no ventrículo esquerdo). No final do período controle, foi coletado o ápice dos ventrículos, no final dos 30 minutos de isquemia, foi retirado a parte medial dos ventrículos, e no final da reperfusão foi coletada a parte mais próxima à base dos ventrículos. Logo que os tecidos ventriculares foram coletados, os mesmos foram congelados em nitrogênio líquido, visando minimizar quaisquer perdas de atividade enzimática. Posteriormente os tecidos foram estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento da homogeneização dos mesmos para as análises enzimáticas.

#### Preparação do homogeneizado

Cada 100 mg de tecido foi homogeneizado em 900 $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,9% (p/v), pH 7.4, utilizando o homogeneizador ultra-turrax (Jamke & Kunkel IKA – Labortechnik Alemanha). As amostras foram homogeneizadas 4 vezes por cerca de 10 segundos na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos na velocidade de  $720 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante utilizado na medida das atividades enzimáticas. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford, onde a albumina de soro bovino foi utilizada como referência (Bradford, 1976).

A atividade de diversas enzimas foi determinada através de medidas de absorção de luz utilizando um espectrofotômetro GBC 920 UV-Vis (GBC Scientific Equipament, Austrália).

Todos os ensaios das atividades enzimáticas foram conduzidos na temperatura fisiológica dos ratos, ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e expressas em unidades (micromoles de

substrato consumido oxidado ou reduzido, conforme o caso, por minuto) por miligrama de proteína.

#### Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada conforme o método descrito por Crapo et al, 1977. Neste método, o superóxido ( $O_2^-$ ) gerado a partir de um sistema xantina-xantina oxidase (X-XO), reduz o citocromo C gerando um aumento na absorção de luz em 550nm. A adição de homogeneizado, contendo SOD, dismuta o  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) impedindo que o citocromo C seja reduzido. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 50mM (pH 8.0) contendo: EDTA 0,1mM; cianeto de potássio 0,01mM; citocromo C 0,02mM e xantina 0,05mM, o volume final da reação foi de 1 mL. A reação do controle foi disparada adicionando xantina oxidase (concentração final 8mU/mL) ao meio de reação, avaliando a redução do citocromo C através do aumento da absorção de luz em 550nm por cerca de 1 minuto e 30 segundos. Em seguida foi adicionado cerca de 10 $\mu$ g de proteína de homogeneizado de coração (cerca de 2 $\mu$ L) e a redução do citocromo C continuou sendo mensurada por mais 2 minutos. A atividade da SOD foi obtida através da diferença da diminuição da redução de citocromo C, observada quando o homogeneizado foi adicionado ao sistema X-XO. A diminuição de 50% da taxa de redução do citocromo C representou uma unidade de SOD. A atividade total da SOD foi expressa em unidades por miligrama de proteína.

#### Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi mensurada conforme o método descrito por Flohé & Günzler, 1984. Neste método, a GPx converte o peróxido em água oxidando a glutathione (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida a GSH pela enzima glutathione redutase (GR), às custas da oxidação do NADPH em NADP. A diminuição da absorção de luz em 340nm promovida pela oxidação de NADPH foi avaliada durante 5 minutos no meio de reação, que serviu de controle do experimento (composição do meio de reação: tampão fosfato de potássio 100mM; EDTA 1mM (pH 7.0); NADPH 0,15mM, glutathione reduzida 0,5mM, GR 240mU/ml e tert-butyl hidroperóxido 1,2mM, o volume de cada reação foi 1mL). Em seguida, foi

adicionado homogeneizado de coração (aproximadamente 50µg de proteína) e a oxidação do NADPH continuou sendo monitorada por mais 5 minutos. A atividade da GPx foi calculada subtraindo a taxa de oxidação do NADPH obtida com e sem homogenado (obtida através de regressão linear). O coeficiente de extinção milimolar do NADPH ( $6,22\text{mM}^{-1}$ ) foi utilizado na determinação da atividade da GPx e esta foi expressa em unidades por miligrama de proteína. Uma unidade representou 1 micromol de NADPH oxidado por minuto.

#### Determinação da Atividade Glutationa Redutase (GR)

A atividade da GR foi calculada conforme o método descrito por Calberg & Mannervik, 1985. A GSSG contida no meio de reação foi reduzida pela GR em GSH, promovendo a oxidação do NADPH em NADP. O meio de reação (composto por: tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7.0); EDTA 1mM; NADPH 0,1mM e glutatona oxidada 1mM, volume final 1 mL) serviu de controle experimental, onde a oxidação do NADPH foi avaliada durante 5 minutos em 340nm. Posteriormente foi adicionado homogeneizado de coração (aproximadamente 50µg de proteína) e a diminuição da absorção de luz em 340nm continuou sendo observada por mais 5 minutos. A diferença entre a taxa de oxidação com e sem homogeneizado representou a atividade da GR. A quantidade (moles) de NADPH oxidado refletiu a atividade da GR e foi obtido utilizando o coeficiente de extinção milimolar do NADPH ( $6,22\text{mM}^{-1}$ ). A atividade enzimática foi expressa em unidades, micromoles de NADPH oxidado por minuto, por miligrama de proteína.

#### Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi mensurada através do desaparecimento do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formando água e oxigênio, conforme descrito por Aebi, 1984. O controle experimental consistiu na avaliação da diminuição da absorção de luz em 240nm do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50mM pH 7.0; triton X-100 0,002%; EDTA 0,1mM; peróxido de hidrogênio 15mM, o volume final da reação foi de 1mL) durante cerca de 2 minutos. Em seguida foi adicionado homogeneizado de coração (aproximadamente 80µg de proteína) e a absorção de

luz continuou sendo acompanhado por mais 2 minutos. A atividade da catalase foi obtida através da diferença entre a taxa de diminuição da absorbância com e sem homogeneizado. Foi calculada através da quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $43,6\text{M}^{-1}$ ). A atividade da enzima foi expressa em unidades (micromoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto) por miligrama de proteína.

#### Determinação da Atividade da Hexocinase

A atividade da hexocinase foi avaliada como descrito no método de Wilson, 1989. Neste método a hexocinase gera glicose-6-fosfato (G6P) + ADP a partir de glicose + ATP. O produto da reação da hexocinase, a G6P, é convertido a 6-fosfo gluconolactona, por meio da enzima G6P desidrogenase, presente no meio de reação do ensaio enzimático, promovendo a redução do  $\text{NAD}^+$  em NADH. A redução do  $\text{NAD}^+$  é acompanhada pelo aumento da absorção de luz em 340nm. O controle experimental consistiu no monitoramento da absorção do meio de reação (Tris-HCl 50mM (pH 7.4);  $\text{MgCl}_2$  6mM; glicose 20mM; glicose 6-fosfato desidrogenase 1U/ml;  $\beta\text{-NAD}^+$  1mM, ATP 1mM, no volume de 1mL em cubeta de quartzo) por 4 minutos. Em seguida foi adicionado o homogeneizado (aproximadamente 120 $\mu\text{g}$  de proteína) e a atividade da HK mensurada durante 4 minutos. A atividade enzimática foi calculada através da diferença entre a taxa de diminuição da absorbância com e sem homogeneizado. O coeficiente de extinção do  $\text{NAD}^+$  ( $6,22\text{ M}^{-1}/\text{cm}$ ), foi utilizado para o cálculo da quantidade de moles de  $\text{NAD}^+$  reduzido por minuto. A atividade da hexocinase foi expressa em unidades (micromoles de  $\text{NAD}^+$  reduzido por minuto), por miligrama de proteína.

#### Determinação da Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi avaliada segundo o método descrito por Zewe & Fromm, 1962. Neste método, a LDH oxida o substrato NADH em  $\text{NAD}^+$ , reduzindo o piruvato a lactato. A taxa de oxidação do NADH refletiu a atividade da enzima, que foi expressa em unidades (micromoles de NADH oxidado por minuto) por miligrama de proteína. O meio de reação (Tris-HCl 100mM (pH 7.5), piruvato de sódio 1mM; NADH 0,2mM – volume final de 1 mL) serviu de controle experimental, onde a taxa

de oxidação do NADH foi avaliada por 3 minutos. Em seguida, a reação foi disparada por meio da adição de homogeneizado (aproximadamente 12µg de proteína). A diminuição da absorção de luz em 340nm, reflexo da oxidação do NADH, foi avaliada durante 2 minutos. A fase linear de oxidação do NADH foi utilizada para determinação da atividade enzimática, que foi calculada através da diferença entre a taxa de diminuição da absorbância com e sem homogeneizado. A quantidade (moles) de NADH oxidada na reação foi obtida utilizando o coeficiente de extinção milimolar do NADH ( $6,22\text{mM}^{-1}$ ).

#### Determinação da Atividade da Citrato Sintase (CS)

A atividade da CS foi avaliada segundo o método de Hansen & Sidell (1983), com modificações. Através desta enzima, os substratos acetil CoA e oxaloacetato formam citrato e citril CoA. O citril CoA transfere seus elétrons para o DTNB (ácido 5,5`-ditiobis 2-nitrobenzoico), reduzindo-o. A redução do DTNB promove um aumento na absorção de luz em 412nm. O controle experimental consistiu no acompanhamento da absorção do meio de reação (Tris 75mM (pH 8.0); ácido oxaloacético 0,5mM; DTNB 0,25mM; acetil CoA 0,03mM – volume final 1 mL) durante 3 minutos. Posteriormente, a reação foi disparada através da adição de homogeneizado (aproximadamente 12µg de proteína), e o aumento da absorção mensurado por 1 minuto e 30 segundos. A diferença entre a fase linear da taxa de redução do DTNB com e sem homogeneizado foi utilizada para a determinação da atividade da CS. A atividade da enzima foi calculada através do coeficiente de extinção molar do DTNB ( $13600\text{ M}^{-1}/\text{cm}$ ) e expressa em unidades (micromoles de DTNB reduzido por minuto) por miligrama de proteína.

#### Determinação da Atividade de Complexos da Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial (Complexo I ao III)

A transferência de elétrons do complexo I ao complexo II da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria foi mensurada conforme descrito por Navarro et al, 2004. Neste método, os elétrons doados pela oxidação do NADH no complexo I foram transferidos para a ubiquinona, reduzindo-a a ubiquinol. O ubiquinol foi oxidado no complexo III, promovendo a redução do citocromo C. A

redução do citocromo C foi mensurada através de ensaio espectrofotométrico, pelo aumento na absorção de luz em 550nm. O controle experimental consistiu no acompanhamento no aumento da absorção do citocromo C do meio de reação (tampão fosfato de K 100mM (pH 7.4), KCN 1mM, citocromo C 0,05mM) com homogeneizado (aproximadamente 300µg de proteína) durante 2 minutos. Em seguida a reação foi disparada pela adição de NADH (concentração final de 0,2mM) e a redução do citocromo C acompanhada por mais 1 minuto em 550nm. O volume final da reação foi de 1mL. O cálculo da atividade foi realizado a partir da diferença da taxa de redução do citocromo c obtida com e sem NADH, utilizando o coeficiente de extinção molar do citocromo C ( $19 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$ ). A atividade do complexo I-III foi expressa em unidades (micromoles de citocromo C reduzido por minuto) por miligrama de proteína.

#### Determinação dos níveis de grupamentos tióis

A quantificação do conteúdo total de grupamentos tióis tecidual foi feita através de ensaio espectrofotométrico, avaliando a quantidade de luz absorvida em 412nm pela redução do DTNB, conforme descrito por Sedlack & Lindsay (1968). Nesse método os grupamentos tióis reduzidos presentes no homogeneizado, interagem com o DTNB reduzindo-o. Quanto maior absorção de luz em 412nm, maior a quantidade (moles) de DTNB reduzido, refletindo a maior a quantidade de tióis reduzidos no homogeneizado.

O homogeneizado foi preparado do mesmo modo do utilizado nos experimentos de atividade enzimática. O controle experimental de cada amostra consistiu no meio de reação sem adição de DTNB (150 µL de TRIS 200mM contendo EDTA 20mM pH 8.2; 50 µL de homogeneizado (cerca de 150 µg de proteína); avolumar para 1mL com metanol absoluto). Esta absorbância foi subtraída posteriormente dos valores obtidos nos tubos eppendorf contendo meio de reação com DTNB (150 µL de TRIS 200mM contendo EDTA 20mM pH 8.2; 50 µL de homogeneizado (cerca de 150 µg de proteína); 10 µL de DTNB 10mM - diluído em metanol absoluto; avolumar para 1mL com metanol absoluto). O meio de reação com e sem DTNB foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente (cerca de 25°C). Em seguida foram centrifugados a 3000 x g por 15 minutos em

temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para estimar o conteúdo de tiol tecidual, através da quantidade de luz absorvida em 412nm. O coeficiente de extinção molar do DTNB ( $13600\text{M}^{-1}/\text{cm}$ ) foi utilizado para calcular a quantidade de moles de DTNB reduzidos em cada amostra. O conteúdo celular de tiol foi expresso em nanomoles de DTNB reduzido/miligrama de proteína.

### 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A significância estatística dos dados obtidos nas diferentes condições experimentais foi testada através de análise de variância (ANOVA) uni ou bivariadas, seguidas pelos testes *a posteriori* de Tukey ou de Bonferroni, respectivamente. Tais resultados foram obtidos através do programa Graphpad Prism, versão 4 (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA). Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  Erro Padrão da Média e em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95% ( $P < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito do exercício e do tratamento com DECA no peso corporal e dos tecidos dos ratos

Os valores de peso corporal dos animais, peso do coração e peso do coração normalizado pelo peso corporal, determinados no final do período experimental encontram-se na tabela 1. Com relação ao peso corporal, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais, tanto no início quanto no final do treinamento. O peso do coração foi maior nos grupos tratados com DECA, quando comparado aos respectivos controles não tratados ( $p < 0,05$  SC vs SD e TC vs TD). Não houve diferença significativa entre os grupos sedentário e treinado tanto nos animais controle (TC vs SC), quanto nos tratados com DECA (TD vs SD). A relação peso do coração versus peso corporal (g/kg) foi significativamente maior nos grupos tratados com DECA, comparando aos respectivos grupos controle, sugerindo um ganho de massa cardíaca promovido pelo DECA.

**Tabela 1. Efeitos do exercício e da administração de decanoato de nandrolona (DECA) sobre o peso corporal e o peso do coração em ratos.**

Grupos	peso corporal (g)		peso do coração (g)	peso coração/peso corporal (g/kg)	n
	semana 1	semana 10			
SC	227 ± 4.9	340 ± 10	1.31 ± 0.06	3.8 ± 0.11	12
SD	221.8 ± 4.1	315.2 ± 7.2	1.35 ± 0.03*	4.3 ± 0.08*	19
TC	218.8 ± 2.5	323 ± 6.9	1.22 ± 0.03	3.7 ± 0.10	10
TD	222.1 ± 5.6	312.6 ± 11.6	1.31 ± 0.05*	4.2 ± 0.19*	11

Os valores são médias ± EPM; n = número de ratos; TC: treinado controle; TD: treinado DECA; SC: sedentário controle; SD: sedentário DECA \* P < 0.05 vs. SC e TC

A tabela 2 expressa o peso de vários tecidos normalizados pelo peso corporal (expresso em %). Foi observado que os grupos tratados com DECA apresentaram diminuição do peso relativo dos testículos e aumento dos rins + supra-renais quando comparados com os grupos controle (SC x SD e TC x TD). Os pesos relativos do gastrocnêmio e fígado foram menores no grupo TC comparado ao grupo SC. Não houve diferença significativa entre as médias de

peso relativo dos pulmões dos diferentes grupos experimentais. O peso relativo da gordura retro peritoneal foi maior nos grupos de animais sedentários (SC e SD) quando comparados a ambos os grupos de animais treinados (TC e TD).

**Tabela 2. Efeitos do exercício e da administração de decanoato de nandrolona (DECA) sobre o peso relativo dos tecidos corporais de ratos.**

	SC	SD	TC	TD
Testículos	0,98±0,02 (n=12)	0,88±0,03 <sup>†</sup> (n=13)	1,06±0,02 <sup>§†</sup> (n=17)	0,95±0,02 (n=12)
Gastrocnêmio	0,71±0,03 (n=12)	0,70±0,02 (n=10)	0,66±0,01 <sup>†,¶</sup> (n=4)	0,72±0,01 (n=6)
Fígado	3,37±0,07 (n=13)	3,32±0,09 (n=14)	3,01±0,08 <sup>*</sup> (n=18)	3,08±0,06 (n=14)
Rins + supra	0,66±0,01 <sup>§</sup> (n=12)	0,76±0,02 (n=14)	0,62±0,01 <sup>§</sup> (n=15)	0,79±0,02 (n=10)
Pulmões	0,57±0,03 (n=13)	0,58±0,02 (n=13)	0,51±0,02 (n=14)	0,48±0,03 (n=8)
Gordura peritoneal	3,10±0,62 (n=4)	2,92±0,53 (n=3)	0,71±0,1 <sup>*</sup> (n=9)	0,74±0,04 <sup>*</sup> (n=4)

Os valores são médias ± EPM; n = número de ratos; peso relativo = (peso do tecido/peso corporal) x 100. SC: sedentário controle; SD: sedentário DECA, TC: treinado controle; TD: treinado DECA. \* p<0,05 vs SC e SD; § p<0,001: vs SD e TD; † p<0,05: vs SC; ¶ p<0,01: vs TD.

#### 4.2. Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre o ECG (*in vivo*)

Buscando averiguar se o treinamento e/ou o tratamento com o anabolizante estariam interferindo na eletrogênese cardíaca dos animais, analisamos a frequência cardíaca (FC), os intervalos PR, QT e QT corrigido (QTc = QT (ms)/√RR(seg)), e o eixo elétrico de QRS. Como observamos na tabela 3, o intervalo QT e o QTc foram menores (p<0,05) nos 2 grupos de animais treinados (TC e TD) quando comparados aos grupos sedentários (SC e SD). O intervalo PR apresentou diminuição (p<0,01) nos animais TC quando comparados aos sedentários (SC e SD). Este efeito indica uma maior velocidade de condução átrio-ventricular nos animais TC, fato que parece ser amenizado pelo tratamento

com DECA (grupo TD). A FC e o eixo elétrico foram semelhantes nos quatro grupos experimentais.

**Tabela 3: Efeito do treinamento e da administração de decanoato de nandrolona (DECA) sobre a frequência cardíaca, intervalo PR, intervalo QT, intervalo QT corrigido (QTc) e eixo elétrico medidos no ECG *in vivo* (derivações DI, DII e DIII).**

	SC	SD	TC	TD
Frequência cardíaca (bpm)	399±11 n = 6	406±17 n = 7	402±16 n = 10	384±21 n = 7
Intervalo PR (ms)	49,85±0,53 n = 6	50,35±2,05 n = 7	44,34±0,71 * n = 10	47,51±1,81 n = 7
Intervalo QT (ms)	76,68±3,08 n = 6	76,28±4,24 n = 7	66±1,66 * n = 10	65,55±2,47* n = 7
Intervalo QTc QTc = QT(ms)/√RR(seg)	197±7 n = 6	195±8 n = 6	171±4 * n = 10	166±6 * n = 7
Eixo Elétrico	45,21±9 n = 3	69,37±6,7 n = 4	62,96±7,6 n = 9	50,08±5,5 n = 7

Os valores são médias ± EPM; n = número de ratos; \* p<0,05: vs SC e SD

### 4.3. Efeito do exercício e do tratamento com DECA sobre as funções cardíacas *in vitro* (Coração Isolado)

#### 4.3.1. Respostas da função contrátil do ventrículo esquerdo (VE) *in vitro* ao exercício e tratamento com DECA

No período do controle experimental (pré-isquemia) foram analisadas a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE – este resultado será mostrado e detalhado no tópico 3.3 Isquemia/Reperusão) e a primeira derivada (dP/dt) do registro da pressão ventricular. A medida da dP/dt reflete a função contrátil (dP/dt+) e a de relaxamento (dP/dt-) do VE. Exemplos de registros de pressão e de dP/dt, e de como os parâmetros avaliados nestes registros foram mensurados se encontram detalhados na figura 12 no materiais e métodos. No gráfico da dP/dt (figura 13) encontramos uma diminuição da função de relaxamento (dP/dt-) nos animais SD, quando comparado aos animais treinados (TC e TD). Estes achados sugerem uma perda na função diastólica, fato que seria

esperado tendo em vista os efeitos deletérios das altas doses de esteróides anabólicos na função cardíaca. O fato do mesmo não ter sido relatado nos animais TD, aponta para um papel protetor do exercício frente aos efeitos deletérios da alta dose de DECA utilizada no presente estudo.

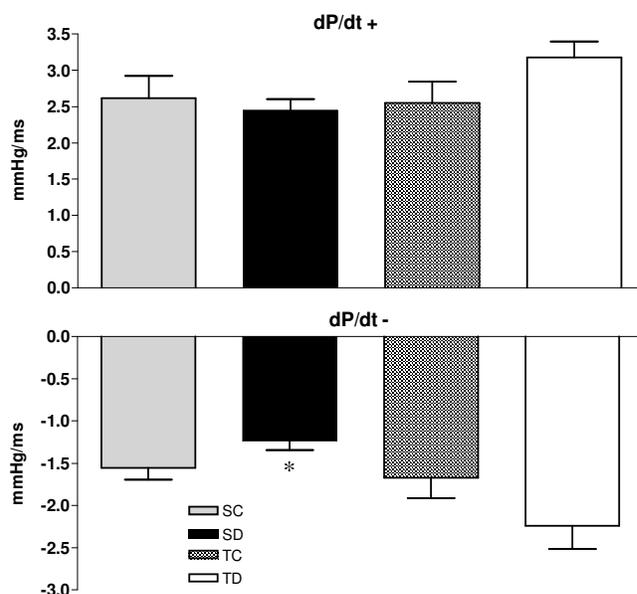


Figura 13: Função contrátil e de relaxamento do VE (dP/dt+ e dP/dt-). Registros obtidos no final do período de controle do experimento de Langendorff (pré-isquemia). SC: n=6; SD: n=7; TC: n=10; TD: n=10.

\*  $p < 0,05$  SD vs TC e TD

#### 4.3.2. Efeitos do exercício e do DECA no ECG do coração isolado

Buscando elucidar os efeitos crônicos do treinamento e da administração do decanoato de nandrolona (DECA) sobre a eletrogênese cardíaca, foram registrados os ECG dos corações isolados de todos os grupos experimentais. Na tabela 4 encontramos os valores de frequência cardíaca (FC), intervalo PR e intervalo QT, avaliados durante o período do controle experimental (pré-isquemia). Observamos que não houve diferenças significativas na FC entre os grupos experimentais. O tratamento com DECA promoveu um aumento no

intervalo PR nos corações dos animais SD com relação aos demais grupos, indicando um retardo na condução átrio-ventricular (caracterizando um bloqueio da condução átrio-ventricular de primeiro grau). O mesmo não foi observado no grupo TD, mostrando que o treinamento foi capaz de impedir tal alteração promovida pelo anabolizante. O intervalo QT apresentou maior duração nos animais tratados com DECA (TD e SD) quando comparados ao grupo TC, sugerindo um retardo na repolarização ventricular promovido pelo tratamento com DECA. O retardo do intervalo QT é um fator de risco para a ocorrência de arritmias ventriculares.

**Tabela 4: Efeitos do treinamento e do decanoato de nandrolona (DECA) sobre a frequência cardíaca, intervalo PR e intervalo QT, medidos em ECG de corações isolados.**

	SC	SD	TC	TD
Frequência cardíaca (bpm)	248±8 n = 9	252±7 n = 9	274±6 n = 10	279±10 n = 9
Intervalo PR (ms)	47,98±1,47 n = 13	54,07±1,7 * § n = 10	44,00±1,47 n = 11	43,55±1,74 n = 9
Intervalo QT (ms)	84,95±3,52 n = 11	90,26±1,53 n = 11	79,46±3,01† n = 12	90,75±2,38 n = 10

Os valores são médias ± EPM; n = número de corações; \* p<0,05: ≠ SC; § p<0,001: ≠ TC e TD; † p<0,05: ≠ TD e SD.

#### 4.3.3. Isquemia/Reperusão (I/R): o exercício e o DECA alteram a tolerância do tecido ventricular a isquemia?

Os corações isolados dos quatro grupos experimentais foram submetidos ao insulto de I/R visando avaliar os efeitos do exercício e do DECA sobre as injúrias induzidas por este estresse no miocárdio. Foram avaliados os parâmetros: pressão diastólica final (PDf VE) e porcentagem da pressão desenvolvida (%PDVE) pelo VE durante os 30 minutos de isquemia e os 60 minutos de reperusão e a área de infarto ao final do período de reperusão. Além disso, a atividade das quatro enzimas antioxidantes, bem como de enzimas envolvidas no metabolismo energético foram determinadas em três pontos distintos do evento de I/R: no final do período controle, no final da isquemia e no final da reperusão.

#### 4.3.3.1. O exercício e o tratamento com DECA interferem nas alterações da Pressão Diastólica (PD) observadas durante o insulto de I/R?

A tabela 5 resume os valores de PD do ventrículo esquerdo no final do período de controle, ao final do período de 30 min de isquemia e aos 10, 30 e 60 min de reperfusão. Ao final do período de isquemia observamos uma contratatura ventricular, ilustrada pelo aumento de cerca de 3 a 4 vezes do valor controle da PD. Este quadro iniciado na isquemia persiste na reperfusão, onde aos 10 min atinge valores de pressão até 10 vezes maiores que o valor controle. Após este pico em 10 minutos, PD sofreu um lento e gradual decréscimo ao longo da reperfusão nos quatro grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças estatísticas no valor de PD entre os grupos ao longo da I/R.

**Tabela 5: Comportamento da Pressão Diastólica (mmHg) durante o insulto de isquemia-reperfusão.**

		SC (n=8)	SD (n=7)	TC (n=11)	TD (n=9)
Controle		9,00±0,47	11,80±1,19	10,21±0,66	10,76±0,69
Isquemia	30min	38,15±6,24	39,08±4,72	40,45±4,14	44,25±2,10
Reperfusão	10 min	90,52±8,03	95,48±12,12	90,64±7,89	114,37±7,15
	30 min	77,00±8,52	79,55±10,96	72,91±11,66	98,96±8,15
	60 min	74,21±10,28	75,28±14,77	69,12±9,95	95,87±7,94

Os valores são médias  $\pm$  EPM; n = número de corações analisados; Controle: período de perfusão normal, após estabilização dos parâmetros funcionais (FC, PDVE); Isquemia: período de isquemia global, sem perfusão coronária; Reperfusão: período de restabelecimento da perfusão com fluxo igual ao do período controle.

#### 4.3.3.2. Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo (PDVE) durante a I/R: o tratamento com DECA aboliu os efeitos positivos do exercício.

Na figura 14 encontramos a resposta da PDVE durante o insulto de I/R, expresso em porcentagem, relativa aos valores de PDVE obtidos no período controle. O comportamento da porcentagem da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (%PDVE) durante a isquemia foi semelhante em todos os grupos. A partir do 5<sup>o</sup> minuto da reperfusão, os animais TC apresentaram melhor recuperação da função contrátil quando comparado ao grupo SC ( $p < 0,05$ ) e do

10<sup>o</sup> minuto até o final da reperfusão com relação aos demais grupos (TC vs SC, SD e TD -  $p < 0,01$ ). O resultado da melhor recuperação pós-isquêmica da função contrátil encontrada nos animais treinados corrobora com outros trabalhos da literatura, reforçando o conceito dos efeitos cardioprotetores desencadeados por diferentes tipos de exercício. Com isto, mostramos que o nosso protocolo de exercício foi capaz de promover maior tolerância ao episódio de I/R através da redução do atordoamento do miocárdio encontrada na reperfusão. O tratamento com DECA impediu o efeito cardioprotetor induzido pelo exercício, de modo que a %PDVE encontrada no grupo TD apresentou valores semelhantes aos encontrados nos ratos sedentários (SC e SD). Não foram encontradas diferenças na recuperação da %PDVE dos corações do grupo SD quando comparados ao SC, mostrando que o tratamento com DECA não foi capaz de agravar os danos na função contrátil dos animais sedentários.

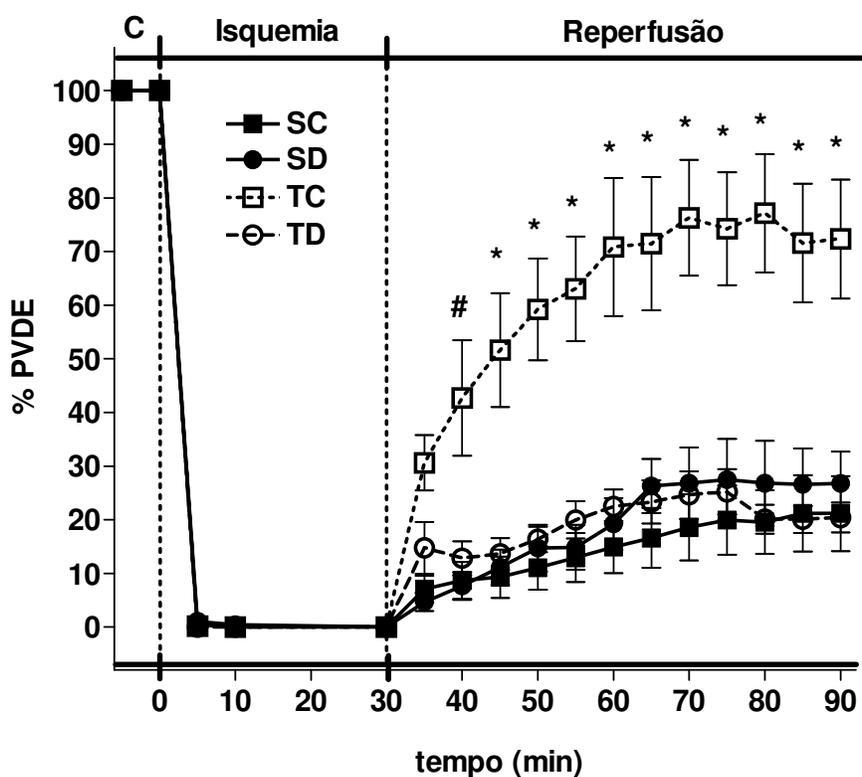


Figura 14: Efeitos do exercício e do tratamento com DECA na função contrátil do ventrículo esquerdo durante o insulto de isquemia/reperfusão. %PDVE - porcentagem da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo; C - período controle. SC - sedentário controle (n=7), SD - sedentário DECA (n=7), TC - treinado controle (n=9), TD - treinado DECA (n=8).

#  $P < 0.01$  em 40 min vs. CS, DS and DT.

\* $P < 0.001$  de 45 até 90 min vs. CS, DS and DT.

#### 4.3.3.3. Área de infarto: O tratamento com DECA promoveu maior lesão na I/R

A figura 15, letras A-D ilustram a área de infarto dos quatro grupos experimentais (SC, SD, TC e TD, respectivamente) ao final do protocolo de I/R. A área clara representa a área infartada e a área escura a do tecido viável, corado com o TTC. Os valores médios da área de infarto estão ilustrados na figura 15 letra E. Neste gráfico, observamos que o grupo TC apresentou menor área de infarto ( $13,85 \pm 2,6\%$   $n=10$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo SC ( $42,7 \pm 2,5\%$   $n=9$ ). É interessante ressaltar que o valor de área de infarto do grupo TC foi semelhante ao obtido em outra linha de pesquisa de nosso laboratório, onde a cardioproteção foi induzida pelo condicionamento isquêmico (Tavares, 2003).

O tratamento com esteróide anabólico impediu os efeitos cardioprotetores do treinamento, resultando em maior área de infarto no grupo TD ( $33,27 \pm 5,3\%$   $n=9$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo TC. O valor da área de infarto no grupo TD não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo SC, mostrando que o tratamento com DECA tornou os corações dos animais treinados tão susceptíveis a isquemia quanto os corações de animais sedentários. O tratamento com DECA aumentou ligeiramente a área de infarto do grupo SD ( $51,3 \pm 4\%$   $n=9$ ), embora o mesmo não tenha apresentado diferença estatística quando comparado ao grupo SC. Embora tenhamos encontrado maior área de infarto nos corações do grupo TD quando comparado ao TC, o grupo TD apresentou redução significativa da área de infarto quando relacionada ao grupo SD. Este dado indica que apesar dos efeitos deletérios do uso de altas doses de DECA, o exercício ainda pode ser capaz de amenizar parte dos danos teciduais nos casos de uso crônico de altas doses de esteróides em corações de ratos sedentários.

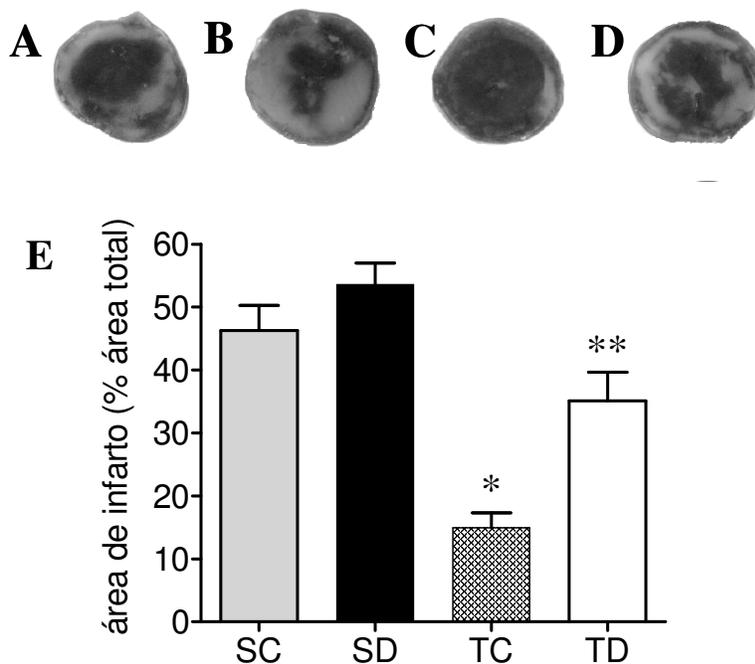


Figura 15: Efeitos do exercício e do tratamento com DECA na área de infarto obtida ao final do protocolo de I/R (após 60 minutos de reperusão), avaliado através do corante TTC. A-D - Fotos representativas da área de infarto nos quatro grupos experimentais. A área escura representa a área viável e a clara a área infartada. **A** - fatia do coração de um rato do grupo Sedentário Controle (SC); **B** - fatia do coração de um rato do grupo Sedentário DECA (SD); **C** - fatia do coração de um rato do grupo fatia do coração de um rato do grupo reinoado controle (TC); **D** - fatia do coração de um rato do grupo Treinado DECA (TD). **E** - Gráfico ilustrando a área de infarto, expressa em porcentagem com relação a área total do ventrículo esquerdo (%AI). SC: n=10, SD: n=9, TC: n=11, TD: n= 10. \* p<0,001: vs SC, SD e TD; \*\* p<0,01: vs SD.

#### 4.3.3.4. Cardioproteção contra lesões de I/R: influência do exercício e do tratamento com DECA na atividade das enzimas antioxidantes

Primeiramente foi mensurada a atividade das enzimas antioxidantes investigando possíveis alterações promovidas pelo treinamento e/ou pelo tratamento com DECA, sem nenhum tipo de estresse de isquemia ou de reperusão (figura 16, ou figura 3 do artigo em anexo). Posteriormente, investigamos se o exercício e/ou o DECA estavam interferindo na atividade destas enzimas durante o evento de I/R. Nesta segunda parte do trabalho, as atividades das enzimas antioxidantes foram avaliadas ao término dos períodos: controle, isquemia e reperusão. As respostas da atividade de algumas enzimas do metabolismo energético (HK, LDH, CS e complexo I-III) durante a I/R também

foram mensuradas, tendo em vista a importância do papel das alterações do metabolismo energético encontradas com a hipóxia gerada pela isquemia.

Na figura 16, encontramos a resposta da atividade das enzimas antioxidantes ao exercício e ao tratamento com anabolizante. Observamos que o exercício promoveu aumento da atividade da SOD e da GPx quando comparadas ao grupo SC (figura 16 A e B). O tratamento com DECA aboliu os efeitos do exercício, de maneira que o grupo TD apresentou menor atividade de SOD, GPx e GR que o grupo TC (figura 16 A-C;  $p < 0.05$ ). Além disso, encontramos tendência de diminuição da atividade da catalase nos grupos SD e TD quando comparados aos grupos controles, sugerindo que o tratamento com anabolizante poderia estar modulando de forma negativa a atividade desta enzima (figura 16 D). As diferenças encontradas nos animais tratados com DECA (figura 16) podem explicar, ao menos em parte, a maior lesão tecidual (figura 15) e menor recuperação da função contrátil (figura 14) encontrados nos ratos TD e a tendência de maior área de infarto no grupo SD.

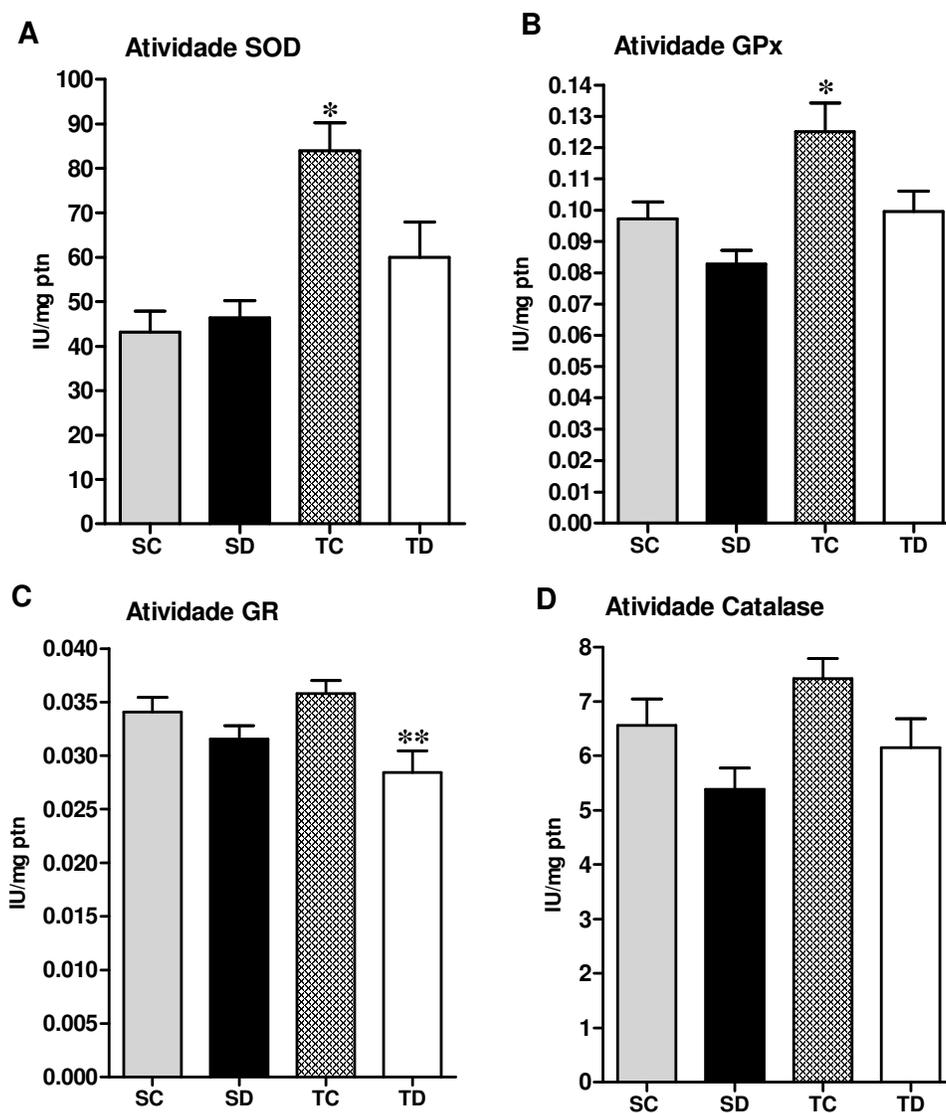


Figura 16: Atividade das enzimas antioxidantes em ratos treinados e/ou tratados com DECA ao término do período experimental de 10 semanas. Em **A** encontramos a atividade da superóxido dismutase (SOD), expressa em média  $\pm$  S.E.; **B** atividade da glutiona peroxidase (GPx) expressa em média  $\pm$  S.E.; **C** atividade da glutiona redutase (GR) expressa em média  $\pm$  S.E.; **D** atividade da catalase expressa em média  $\pm$  S.E. Sedentário Controle (CS) n=10; Sedentário DECA (SD) n=14; treinado controle (CT) n=7; treinado DECA (n=8). \*  $p < 0,05$  vs. SC, SD e TD; \*\*  $p < 0,05$  vs TC.

Abordando a segunda parte do trabalho, a resposta das atividades enzimáticas frente o insulto de I/R, observamos que a isquemia promoveu um aumento na atividade de praticamente todas as enzimas antioxidantes. Este aumento foi transitório e independente do exercício ou do tratamento com DECA, de modo que as atividades ao final da reperfusão foram semelhantes as do

período controle (figuras 17-20). Analisando a atividade da enzima SOD (figura 17), encontramos que a isquemia promoveu aumento significativo no grupo SC ( $P < 0,05$  isquemia vs controle e reperfusão). Os demais grupos apresentaram tendência de aumento da atividade da SOD no período de isquemia, porém sem relevância estatística. A enzima catalase apresentou maior atividade durante a isquemia em todos os quatro grupos experimentais ( $P < 0,05$  isquemia vs controle), sugerindo que esta regulação seria independente do exercício ou do uso de anabolizante (figura 18). A atividade da GPx e da GR (figuras 19 e 20) se comportaram de modo bem parecidos durante a I/R. Os grupos SD e TC apresentaram maior atividade de GPx e GR na isquemia quando comparados ao período de reperfusão ( $P < 0,05$ ). O grupo TD mostrou diminuição da atividade da GPx na reperfusão quando comparado ao controle e à isquemia ( $P < 0,05$ ), e aumento da atividade da GR durante a isquemia vs a reperfusão ( $p < 0,05$ ). Nossos dados sugerem que as atividades das enzimas antioxidantes estariam sendo reguladas de forma rápida durante o período de isquemia de modo independente do exercício ou do tratamento com DECA.

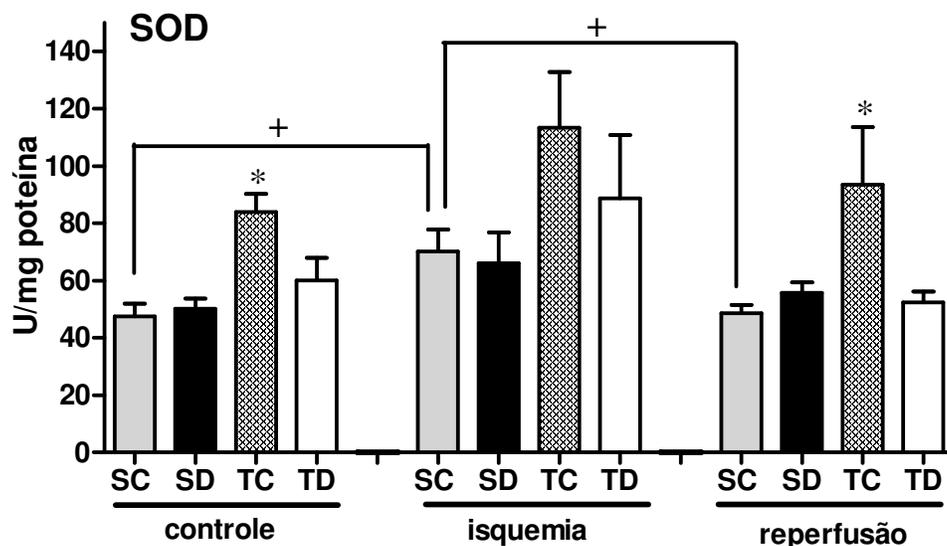


Figura 17: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade total da enzima superóxido dismutase (SOD) durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=12, I n=11, R n=11); SD - sedentário DECA (C n=16, I n=12, R n=11); TC - treinado controle (C n=7, I n=8, R n=8); TD - treinado DECA (C n=10, I n=8, R n=8).

\*  $p < 0.05$  TC vs SC, SD, TD; +  $p < 0.05$  SC isquemia vs SC controle e SC reperfusão.

Quanto à resposta específica do exercício ou do tratamento com DECA na atividade das enzimas antioxidantes durante a I/R, encontramos maior atividade da SOD nos períodos controle e na reperfusão nos animais TC quando comparados aos animais SC e TD ( $P < 0,05$  TC vs SC e TD). Tendência semelhante foi observada na atividade da SOD nos animais TC durante a isquemia, porém não foi encontrada diferença estatística (figura 17). Avaliando a atividade da enzima catalase, observamos que os grupos SD e TD apresentaram uma diminuição significativa da atividade no período de isquemia quando comparados ao grupo SC (figura 18). Os animais SD apresentaram uma tendência de redução da atividade da catalase no período controle quando comparados aos demais grupos experimentais. Este achado de diminuição da atividade de catalase é condizente com a tendência de aumento de área de infarto observada no grupo SD (figura 15). Avaliando a enzima GPx, foi encontrado que o treinamento induziu aumento significativo da atividade desta no grupo TC nos períodos de controle quando comparado aos demais grupos e no

de isquemia quando comparado aos grupos SC e SD (figura 19). Apesar de não termos encontrado diferença estatística, o tratamento com DECA parece ter impedido o aumento da atividade da GPx nos corações dos ratos treinados (grupo TD). Deste modo, os corações dos animais TD apresentaram uma tendência de menor atividade da GPx nos no período de isquemia e de reperfusão (figura 19). A atividade da enzima GR também foi afetada pelo tratamento com DECA nos animais treinados nos períodos de controle e de reperfusão, onde os ratos TC exibiram maior atividade que os TD (figura 20). De modo geral, encontramos maior atividade das enzimas antioxidantes nos ratos TC quando comparados aos TD. Esse fato poderia explicar a perda da cardioproteção observada com o tratamento com DECA.

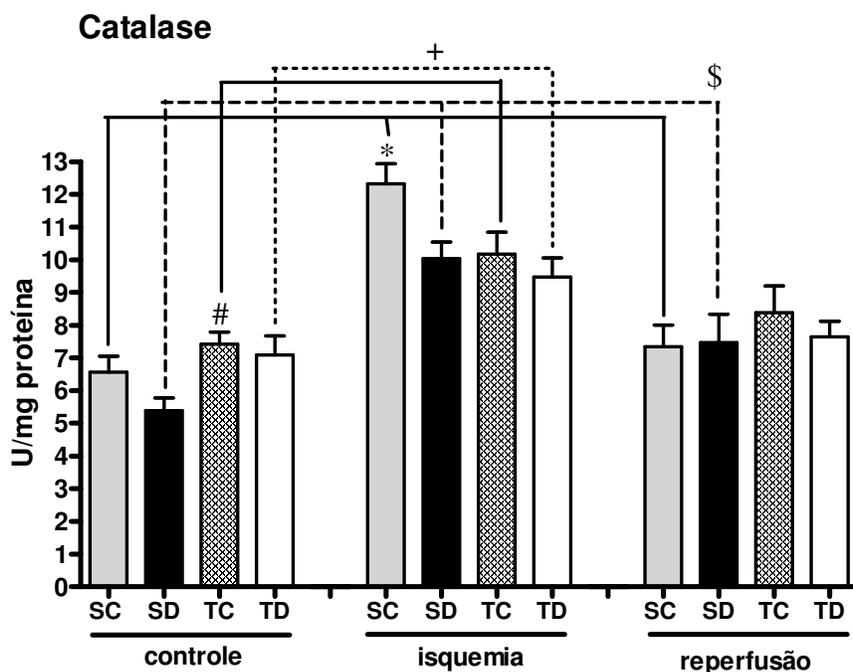


Figura 18: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima catalase durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=12, I n=11, R n=11); SD - sedentário DECA (C n=16, I n=12, R n=11); TC - treinado controle (C n=7, I n=8, R n=8); TD - treinado DECA (C n=10, I n=8, R n=8).

#  $p < 0.05$  TC vs SD; \*  $p < 0.05$  SC isquemia vs SC controle e SC reperfusão, SD isquemia vs SD controle e SD reperfusão, TC isquemia vs TC controle, TD isquemia vs TD controle; +  $p < 0.05$  SC controle e SD reperfusão, TC isquemia vs TC controle, TD isquemia vs TD controle; \$  $P < 0.05$  SD reperfusão vs SD controle.

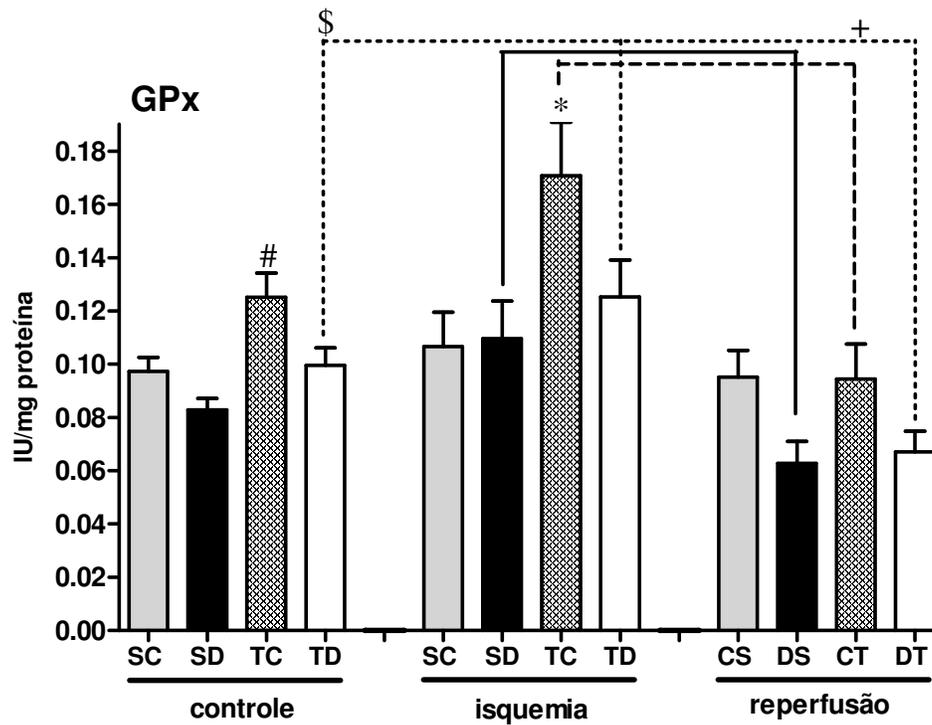


Figura 19: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=12, I n=11, R n=11); SD - sedentário DECA (C n=16, I n=12, R n=11); TC - treinado controle (C n=7, I n=8, R n=8); TD - treinado DECA (C n=10, I n=8, R n=8). # p < 0.05 TC vs SC, SD e TD; \* p < 0.05 TC vs SC, SD; + p < 0.01 SD isquemia vs SD reperfusão, TC isquemia vs TC reperfusão, TD isquemia vs TD reperfusão; \$ TD controle vs TD reperfusão.

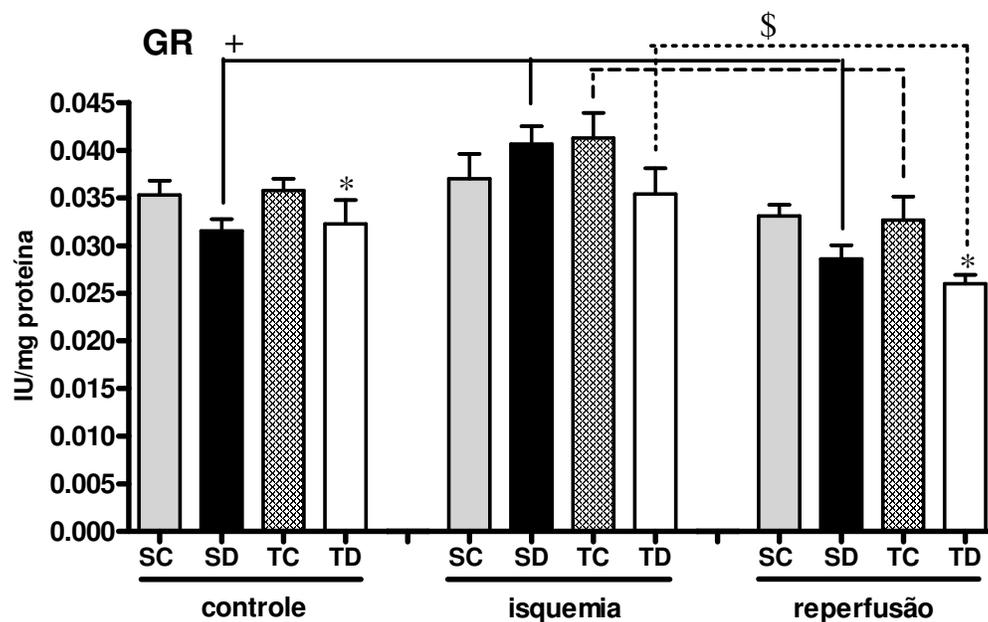


Figura 20: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima glutathione redutase (GR) durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=12, I n=11, R n=11); SD - sedentário DECA (C n=16, I n=12, R n=11); TC - treinado controle (C n=7, I n=8, R n=8); TD - treinado DECA (C n=10, I n=8, R n=8).

\*  $p < 0.05$  TD vs SC e TC; +  $p < 0.001$  SD controle vs SD isquemia; #  $p < 0.001$  SD isquemia vs SD reperfusão,  $p < 0.05$  TC isquemia vs TC reperfusão, TD isquemia vs TD reperfusão.

Tendo em vista que uma menor capacidade antioxidante enzimática poderia acarretar em maior estresse oxidativo, refletindo em menor conteúdo de tióis teciduais, foram mensurados os níveis dos tióis durante o insulto da I/R, avaliando os efeitos do treinamento e do tratamento com DECA (figura 21). Os animais SC, SD e TD apresentaram uma redução significativa dos níveis de tióis ao término do evento de I/R. Este dado indica que estes tecidos foram submetidos a um estresse oxidativo, refletindo na oxidação das defesas antioxidantes não enzimáticas. Os animais TC mostraram níveis semelhantes de tióis durante toda a I/R, sugerindo que as defesas antioxidantes enzimáticas estariam impedindo que as ROS oxidassem as defesas antioxidantes não enzimáticas (figura 21 A). Ao avaliar o impacto do treinamento e do uso de DECA no conteúdo dos tióis de cada grupo foi constatado que nem o exercício, nem o DECA foram capazes de alterar os níveis de tióis basais do tecido cardíaco, avaliado no período controle. No período de isquemia também não foram encontradas diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais. No período de reperfusão foi observado

que o grupo TC apresentou níveis mais elevados de tióis que os demais grupos, refletindo uma menor oxidação dos tióis ao término do evento de I/R. (figura 21). Estes dados sugerem que a maior atividade das enzimas antioxidantes encontrada no grupo TC estaria diminuindo o estresse oxidativo tecidual durante a I/R, acarretando na manutenção dos níveis dos tióis observada ao término da reperfusão neste grupo.

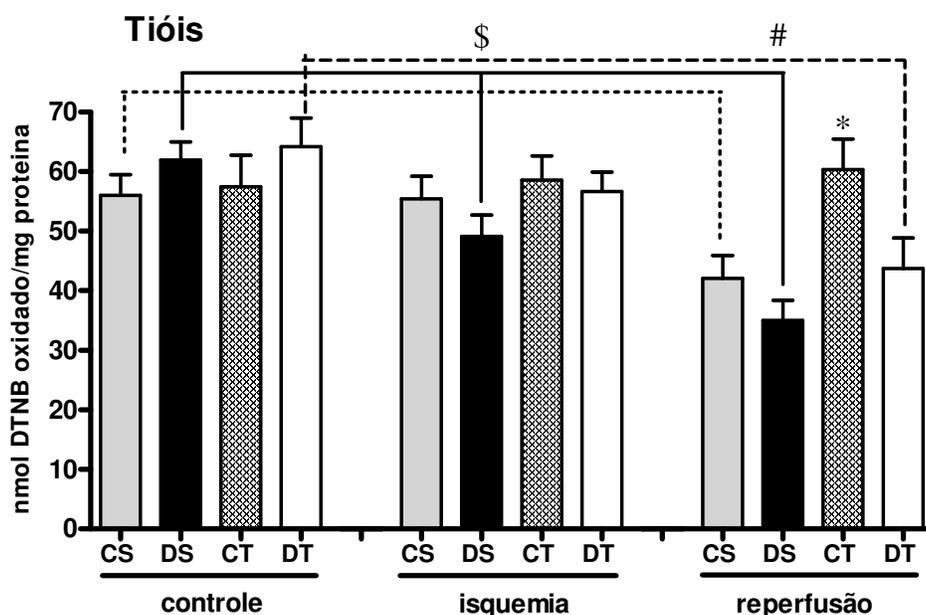


Figura 21: Efeito do exercício e do tratamento com DECA nos níveis de tióis presentes no tecido cardíaco durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=10, I n=10, R n=6); SD - sedentário DECA (C n=9, I n=9, R n=6); TC - treinado controle (C n=4, I n=7, R n=5); TD - treinado DECA (C n=3, I n=7, R n=5). A - níveis de tióis: valores absolutos; B - níveis de tióis: valores relativos, normalizados pelos valores do período controle.

\*  $p < 0.05$  TC vs SC e SD ; \$  $p < 0.05$  SC isquemia vs SC reperfusão, SD isquemia vs SD controle e SD reperfusão; #  $P < 0.05$  SC controle vs SC reperfusão; SD controle vs SD reperfusão; TD controle vs TD reperfusão .

#### 4.3.3.5. Influência do exercício e do DECA na atividade das enzimas do metabolismo energético durante a I/R

Como relatado no capítulo da introdução, as lesões de I/R estão relacionadas com o déficit de ATP durante a isquemia. Na isquemia, o suprimento de oxigênio fica prejudicado, logo, pequenas alterações na atividade de enzimas do metabolismo glicolítico e, principalmente, do oxidativo podem ser

determinantes no processo de morte ou de sobrevivência celular. Além disso, sabe-se que a hipóxia, através do HIF-1, é capaz de regular positivamente algumas enzimas do metabolismo energético. Dentre estas enzimas destacamos a hexocinase (HK), por ser uma enzima limitante do metabolismo glicolítico, e a lactato desidrogenase (LDH), que muitas vezes é utilizada como marcador de injúrias teciduais por ser liberada no efluente de tecidos lesados. Dentre as várias enzimas do metabolismo energético, escolhemos a HK e a LDH como representantes da via glicolítica porque ambas são reguladas pelo HIF, logo, se este estiver sendo ativado, ambas as enzimas poderiam apresentar atividade aumentada. As enzimas do metabolismo oxidativo que foram investigadas não são reguladas pelo HIF-1. A citrato sintase (CS) foi escolhida por ser utilizada na literatura como marcador de conteúdo mitocondrial tecidual. Através da sua atividade podemos avaliar se o treinamento e/ou o DECA interferiram no conteúdo de mitocôndrias presente no tecido cardíaco. Visando compreender se a etapa inicial de transferência de elétrons na mitocôndria estava sendo afetada pelo exercício e/ou pelo tratamento com o anabolizante foi avaliada a atividade de transferência de elétrons do complexo I ao III.

A hexocinase (HK) é uma enzima chave do metabolismo glicolítico, cuja importância é exacerbada durante a isquemia devido a maior solicitação desta via metabólica devido a diminuição progressiva dos níveis de  $O_2$  celulares. Durante o evento de I/R, os animais treinados foi observado aumento da atividade da HK no período de isquemia ( $P < 0,05$  período de isquemia vs controle e reperfusão), sugerindo uma maior atividade do metabolismo glicolítico. Este achado contribuiria com uma maior geração de energia durante a isquemia, podendo refletir no achado de menor lesão tecidual encontrada nos ratos TC (figura 22). Os demais grupos apresentaram valores similares de atividade de HK durante a I/R, indicando que os efeitos do exercício foram abolidos pelo tratamento com o DECA nos animais TD. Quanto às diferenças entre os grupos experimentais (figura 21), encontramos que no período controle o tratamento com o anabolizante promoveu diminuição da atividade da HK nos animais SD ( $P < 0,05$ ) vs SC. No período de isquemia os animais TC apresentaram maior atividade da HK que os grupos SC e SD ( $P < 0,05$ ), e uma tendência quando comparado ao grupo TD (apesar de não ter apresentado diferença estatística, TC vs TD). Na reperfusão não foram encontradas diferenças entre os quatro grupos.

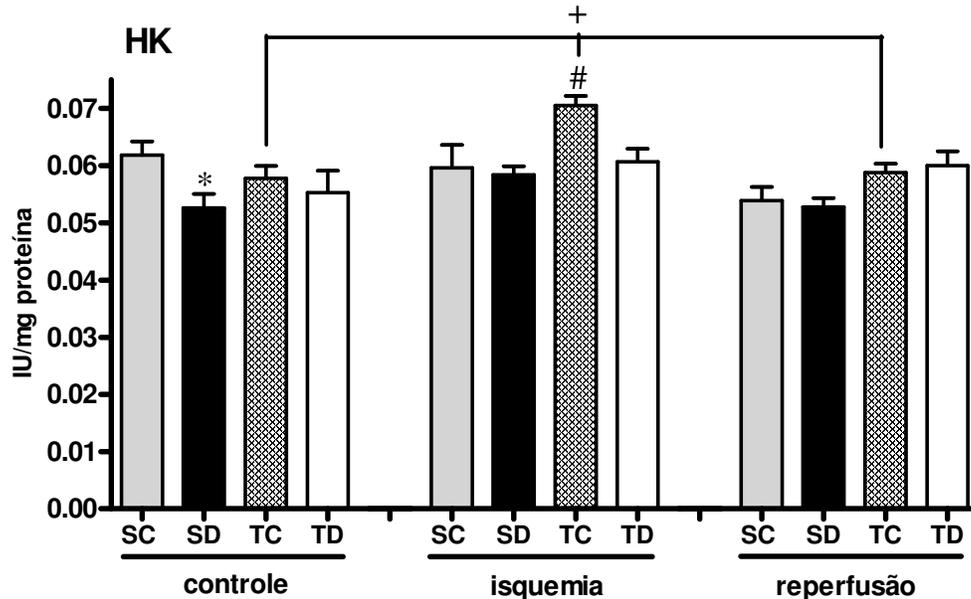


Figura 22: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima hexocinase (HK) durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=10, I n=10, R n=6); SD - sedentário DECA (C n=9, I n=8, R n=6); TC - treinado controle (C n=4, I n=6, R n=5); TD - treinado DECA (C n=3, I n=7, R n=5).  
 \*  $p < 0.05$  SD vs SC; #  $p < 0.05$  TC vs SC e SD; +  $p < 0,001$  TC isquemia vs TC controle e TC reperfusão.

Investigando o comportamento da LDH durante a I/R, constatamos que ao contrário do observado com a HK, a LDH dos animais TC não apresentaram alteração da atividade com a isquemia (figura 23), sugerindo que o aumento da atividade da HK observada na figura 22 não ocorreu por ativação do HIF-1. Na reperfusão, os animais sedentários (SC e SD) apresentaram uma diminuição de atividade de LDH quando comparados com o período controle ( $P < 0,05$ ). Esta diminuição foi independente do tratamento com DECA e pode ter sido reflexo de uma liberação de conteúdo de enzima durante o episódio de I/R. No que diz respeito a análise da atividade entre os grupos, o tratamento com DECA parece não ter influenciado na atividade desta enzima. Não foi encontrada diferença entre os grupos no controle (figura 23), porém, no período de isquemia e no de reperfusão foi detectada diminuição da atividade da LDH nos animais SD quando comparados ao TD.

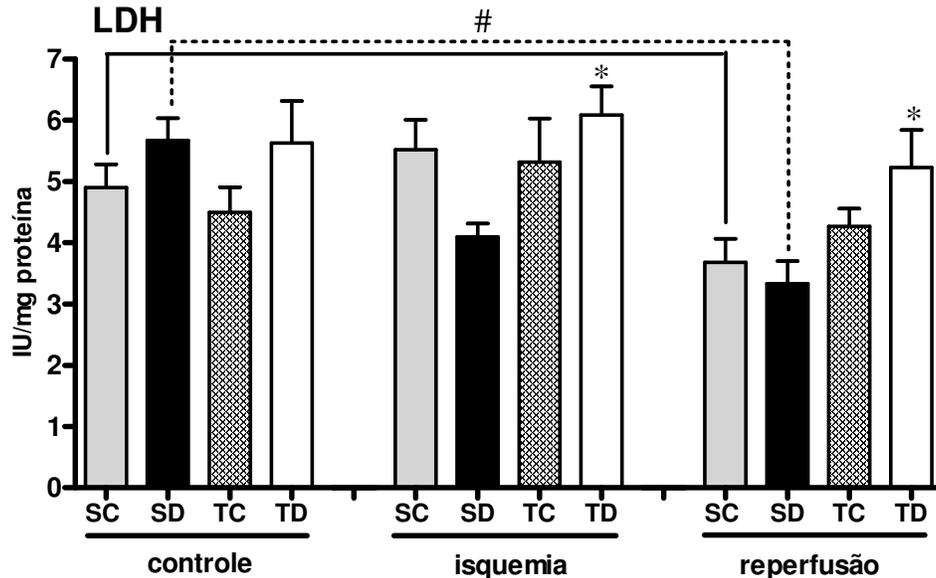


Figura 23: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) durante o evento de isquemia reperfusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=10, I n=10, R n=6); SD - sedentário DECA (C n=9, I n=8, R n=6); TC - treinado controle (C n=4, I n=6, R n=5); TD - treinado DECA (C n=3, I n=7, R n=5).  
 \*  $p < 0.05$  TD vs SD; #  $p < 0.05$  SC isquemia vs CS reperfusão; +  $p < 0.001$  SD controle vs SD reperfusão.

Como comentado anteriormente, a atividade da CS (figura 24) serviu de marcador do conteúdo mitocondrial do tecido ventricular cardíaco. A atividade da CS não foi influenciada pelo evento de I/R em nenhum dos grupos experimentais, de modo que cada grupo apresentou valor similar de atividade de CS no período de controle, de isquemia e de reperfusão. Também não foi encontrada alteração de atividade da CS entre os grupos experimentais, indicando que nem o treinamento nem o uso do DECA interferiram no conteúdo de mitocôndrias do miocárdio (figura 24).

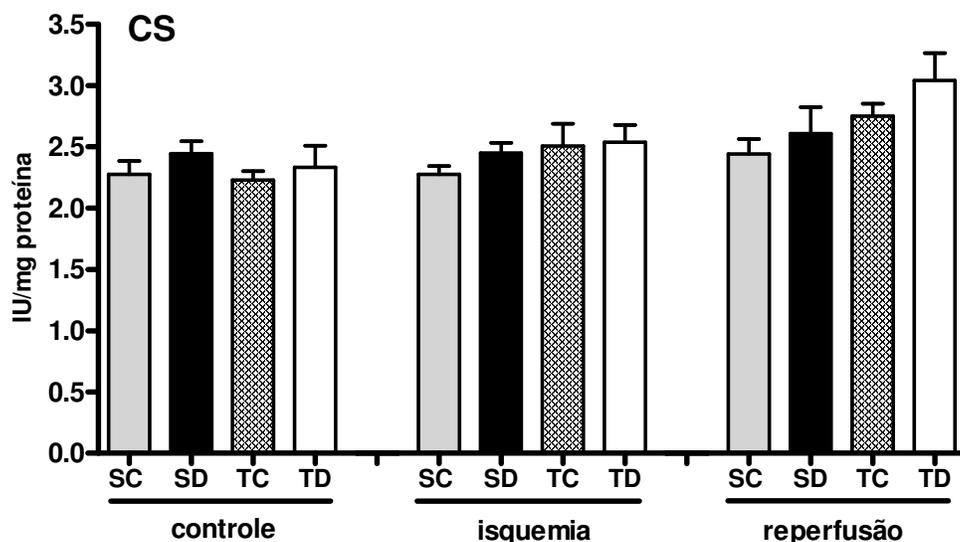


Figura 24: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade da enzima citrato sintase (CS) durante o evento de isquemia reperusão. controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperusão. SC - sedentário controle (C n=10, I n=10, R n=6); SD - sedentário DECA (C n=9, I n=8, R n=6); TC - treinado controle (C n=4, I n=6, R n=5); TD - treinado DECA (C n=3, I n=7, R n=5).

Avaliando a atividade de transferência de elétrons do complexo I ao III da cadeia transportadora de elétrons (CI-III), observamos que o tratamento com DECA não influenciou na atividade do CI-III nos animais SD frente ao insulto de I/R (figura 25). O exercício promoveu um aumento da atividade do CI-III no período de isquemia, retornando a valores mais baixos de atividade na reperusão. Esta resposta de aumento da atividade durante a isquemia foi abolida pelo uso do DECA, de modo que o grupo TD apresentou valores mais baixos de atividade do CI-III durante a isquemia quando comparado aos valores do período do controle. As respostas de aumento da atividade do CI-III (figura 25) e da HK (figura 22) promovidas pelo exercício durante a isquemia, apontam para um melhor suprimento energético no período de isquemia. O menor déficit de ATP durante a isquemia, associado com o menor estresse oxidativo nos animais treinados poderia explicar a menor lesão tecidual e melhor função contrátil (figura 14 e 15) encontrados neste grupo frente ao insulto de I/R.

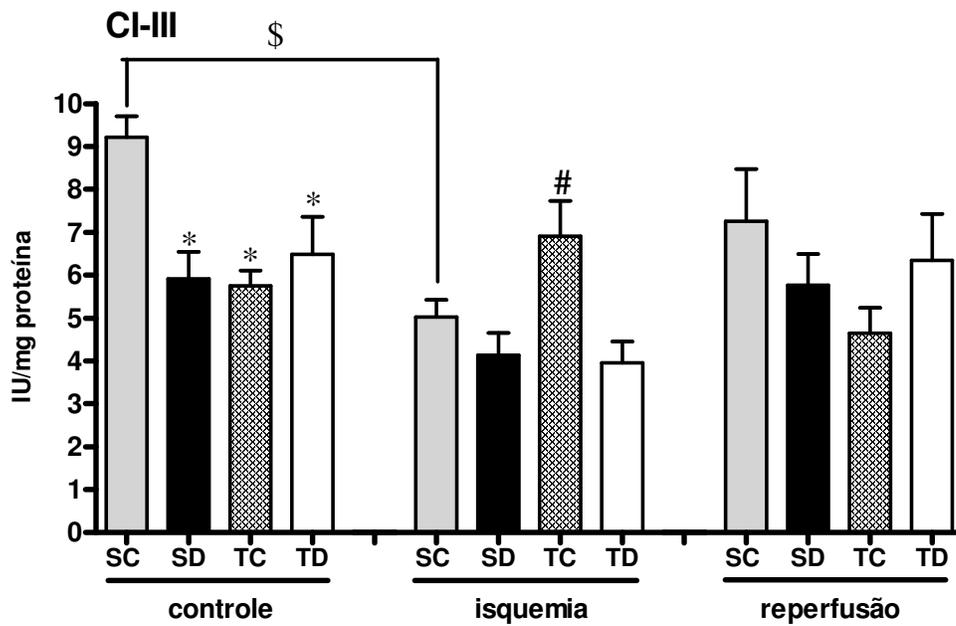


Figura 25: Efeito do exercício e do tratamento com DECA na atividade de transferência de elétrons do complexo I ao II da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CI-III). controle (C) - tecido coletado aos 30 minutos do período controle; isquemia (I) - tecido coletado aos 30 minutos do período de isquemia; reperfusão (R) - tecido coletado aos 60 minutos do período de reperfusão. SC - sedentário controle (C n=10, I n=10, R n=6); SD - sedentário DECA (C n=9, I n=8, R n=6); TC - treinado controle (C n=4, I n=6, R n=5); TD - treinado DECA (C n=3, I n=7, R n=5).

\*  $p < 0.01$  SC vs SD, TC e TD; #  $p < 0.05$  TC vs SD e TD; \$  $p < 0.001$  SC controle vs SC isquemia.

## 5. DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos do exercício na prevenção e tratamento de doenças do sistema cardiovascular têm sido foco de inúmeros trabalhos na literatura (Berlin & Colditz, 1990; Lee et al., 1995; Zhang et al., 2000; Paroo et al., 2002). Associado ao exercício, há relatos de uso indiscriminado de esteróides anabólicos por atletas e não atletas, visando o aumento de performance e/ou melhora da aparência física (American Academy of Pediatrics, 1997; Boyce, 2003). Apesar dos inúmeros estudos acerca dos efeitos dos anabolizantes sobre sistema cardiovascular, pouco se sabe sobre sua implicação nos episódios de I/R e os mecanismos pelos quais estes hormônios atuam. Tendo este panorama em mente, achamos importante ressaltar os principais achados do presente trabalho antes de iniciarmos propriamente a discussão:

- O tratamento crônico com doses supra-fisiológicas do anabolizante decanoato de nandrolona (DECA) prejudicou a cardioproteção induzida pelo exercício (figuras 14 e 15). De modo que os ratos do grupo TD apresentaram maior área de infarto e menor recuperação da função contrátil ao término do evento de isquemia/reperfusão (I/R).
- A maior tolerância do tecido cardíaco ao insulto de I/R encontrado no grupo treinado controle (TC) parece estar relacionada com adaptações como a regulação positiva da atividade de enzimas antioxidantes (figura 16) resultantes do estresse oxidativo moderado induzido pelo exercício. O aumento da atividade da SOD, GPx e GR nos animais TC possivelmente promoveu uma detoxificação mais eficiente das espécies radiculares produzidas durante o período de isquemia e principalmente no de reperfusão, impedindo a oxidação dos tióis durante o evento de I/R (figura 21). Tal adaptação foi impedida pelo tratamento com DECA (grupo TD).
- Os animais TC apresentaram maior atividade da enzima hexocinase (HK) e da transferência de elétrons do complexo I-III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CI-III) durante o período de isquemia (figuras 22 e 25). Este achado poderia estar promovendo uma maior ressíntese de ATP durante a isquemia e principalmente no início da reperfusão. Além disso, a glicose 6-fosfato, produto da reação da HK, quando oxidada na via das pentoses, reduz o NADP em NADPH, atuando como uma enzima antioxidante auxiliar, colaborando para a

manutenção dos níveis de GSH celular necessário para a atividade antioxidante da GPx.

- O papel deste conjunto de adaptações induzidas pelo exercício na cardioproteção ao evento de I/R é reforçado tendo em vista que o tratamento com DECA impediu os efeitos cardioprotetores induzidos pelo exercício (figura 14 e 15), assim como as adaptações provenientes do mesmo (figura 16, 22 e 25).

### **5.1. Efeito do exercício e do tratamento com DECA no peso corporal e dos tecidos dos ratos**

O exercício crônico promove uma série de alterações metabólicas, estruturais e na composição corporal tanto em seres humanos quanto em animais. Relatos como aumento da massa magra, diminuição do percentual de gordura e hipertrofia do ventrículo esquerdo são achados comuns, porém extremamente dependentes do tipo, da duração e da intensidade do exercício, resultando nas diferentes adaptações descritas na literatura (Bowles et al, 1992; Powers et al, 1998; Jin et al, 2000; Woodiwiss et al, 2000; Jew & Moore, 2002; Brown et al, 2003). Os dados sumarizados nas tabelas 1 e 2 mostraram os efeitos do exercício e do tratamento com DECA no peso dos animais e de alguns tecidos dos mesmos. O treinamento (grupo TC e TD) adotado neste trabalho promoveu uma pequena redução no ganho de peso durante o período experimental (tabela 1). Embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas, ela pode refletir o menor acúmulo de gordura peritoneal encontrado nestes animais (tabela 2). A redução de gordura com a prática de atividade física é um achado relativamente comum, porém dependente do tipo, da duração e da intensidade da mesma, onde exercícios com duração superior a 30 minutos e intensidade moderada favorecem tal redução (Pavlou et al., 1985; McMurray et al., 1985; VanHorn et al., 1994; Broeder et al., 1997). Apesar de acreditarmos que o protocolo de treinamento adotado possuiu um componente anaeróbio relevante, pois os ratos foram obrigados a correr na maior velocidade que toleraram durante intervalos curtos de tempo, o resultado da tabela 2 sugeriu que o mesmo também apresentou um componente aeróbio significativo, acarretando na diminuição no peso da gordura peritoneal e, talvez, na redução do peso do fígado. Os efeitos do exercício na redução do peso da gordura peritoneal e do peso relativo do fígado (nos grupos

TC e TD – tabela 2) poderia ser reflexo de maior lipólise e glicogenólise, respectivamente, mediado por citocinas como a IL-6, cujos níveis encontram-se aumentados durante e após a atividade física (Pedersen et al, 2001).

Os efeitos dos esteróides anabólicos sobre o peso corporal é um tópico controverso na literatura. Foram encontrados relatos de peso inalterado e outros no quais se encontrou aumento, quando avaliados em animais treinados (Bhasin et al., 1996; Tamaki et al., 2001; Woodiwiss et al, 2000). Em animais sedentários foi relatado diminuição do peso corporal associado ao tratamento com anabolizantes (Trifunovic et al, 1995; Pereira Jr et al, 2006). Esta divergência de resultados pode ser proveniente dos diferentes tipos e dosagens de esteróides anabólicos, da idade dos animais, do tipo de exercício, dos modelos experimentais e das formas de tratamento utilizados. Em nosso estudo, foi observada uma pequena alteração no peso corporal dos animais tratados com DECA (grupos SD e TD - tabela 1), que não pode ser justificada pela diminuição de tecido adiposo visceral (tabela 2), pois os animais SD e TD apresentaram valores semelhantes de gordura retro peritoneal quando comparados aos seus respectivos controles (SC e TC). A redução da ingestão de alimentos também não parece ser a responsável por tal achado, tendo em vista que o estudo de Trifunovic et al (1995) mostraram que os animais tratados com anabolizante apresentaram diminuição do peso corporal, porém não foi encontrada alteração tanto na ingestão de alimentos, quanto na absorção gastrointestinal de energia.

A utilização de altas doses de anabolizante também pode promover hipertrofia cardíaca e atrofia testicular (Tingus & Carlsen, 1993; Cowan & Kicman, 1997; American Academy of Pediatrics, 1997; Wodiwiss et al, 2000; Shahidi, 2001). Neste contexto, a tabela 1 revelou que o tratamento crônico com DECA promoveu aumento do peso absoluto e relativo do coração tanto no grupo SD quanto no TD, sugerindo uma hipertrofia cardíaca devido ao uso das altas doses de anabolizante. Na tabela 2, foi observado que os grupos SD e TD apresentaram uma diminuição no peso dos testículos, indicando uma atrofia testicular induzida pelas altas concentrações plasmáticas de anabolizante. Segundo Minto et al (1997) o tratamento com androgênios elevaria o nível destes hormônios na corrente sanguínea, promovendo um “*feedback*” negativo no eixo hipotálamo-hipófise, acarretando na diminuição da secreção de hormônio luteinizante e folículo estimulante no hipotálamo. Sabendo que o hormônio folículo estimulante é

responsável pelo trofismo testicular, a inibição de sua secreção levaria a atrofia testicular e explicaria os achados da tabela 2 nos animais SD e TD. O tratamento com DECA também promoveu um aumento do peso dos rins e das supra-renais (TD vs TC e SC; SD vs TC e SC).

## **5.2. Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre a função elétrica cardíaca *in vivo* e *in vitro***

O treinamento rigoroso pode promover aumento do volume ventricular esquerdo e do volume diastólico, aumento da espessura da câmara do ventrículo esquerdo, bradicardia sinusal durante o repouso, aumento do intervalo PR, alargamento do complexo QRS e alterações na repolarização (Mukerji et al, 1989; Da Costa et al, 2002). Em nosso trabalho, a FC foi similar em todos os grupos experimentais, tanto na avaliação *in vivo* (tabela 3), quanto *in vitro* (tabela 4). Os dados obtidos na tabela 3 sugerem, a princípio, que tanto o exercício quanto o uso do DECA não estariam interferindo no controle autonômico do coração. Apesar disto, sabe-se que a utilização do éter como anestésico está relacionado com a diminuição da FC e de vários parâmetros hemodinâmicos (Walsh, 1979), e que atletas, durante o repouso, podem apresentar bradicardia sinusal, proveniente de um aumento do tônus parassimpático (Da Costa et al, 2002), alertando para a possibilidade do éter estar acobertando alguma alteração na regulação autonômica cardíaca. Neste sentido, o trabalho de Pereira-Jr et al (2006), também desenvolvido em nosso laboratório, porém utilizando ratos com idade mais avançada, avaliou a variabilidade da FC *in vivo* sem o uso de anestésicos. O autor observou que os ratos sedentários tratados com DECA durante oito semanas, na dose de 10mg/Kg apresentaram uma disfunção parassimpática. Deste modo, embora tenhamos um indício negativo de alteração de tônus autonômico na tabela 3, alertamos que o mesmo pode ter acontecido, porém o resultado pode ter sido acobertado pelo uso do anestésico. A avaliação do ECG *in vitro* (tabela 4) apresentou dados mais conclusivos, tendo em vista que neste protocolo os corações estavam isolados, livres de qualquer influência simpática e parassimpática. Como a FC foi semelhante em todos os grupos, podemos afirmar que tanto o treinamento quanto o tratamento com DECA não

interferiram na eletrogênese cardíaca (tanto na situação de controle – tabela 3, quanto na pós-isquêmica – dados não mostrados).

A diminuição do intervalo PR encontrada nos animais TC *in vivo* (tabela 3) poderia estar ligada a alterações iônicas e teciduais como expressão e modulação das junções comunicantes (GAPs) no tecido de condução átrio-ventricular, tendo em vista que mudanças na densidade desses canais poderiam gerar alterações na condução átrio-ventricular e arritmias (Camm et al, 1978; Gutstain et al, 2001). Na análise eletrocardiográfica *in vitro* (tabela 4), foi detectado um aumento no intervalo PR nos animais SD quando comparados aos demais grupos (SC, TC e TD). A maior duração do intervalo PR caracteriza um bloqueio de primeiro grau, que parece ser dependente do tratamento com DECA. A origem deste bloqueio nos ratos SD foi independente de modulação autonômica, pois os corações encontravam-se desnervados. A atividade física estaria sendo capaz de impedir tal efeito do anabolizante, já que o intervalo PR dos ratos TD foram semelhantes aos valores encontrados no grupo TC.

O aumento do intervalo e da dispersão do QT é um parâmetro eletrocardiográfico que parece estar correlacionado com a incidência de eventos arritmogênicos que poderiam levar a morte súbita (Stolt et al, 1999). No presente trabalho (tabela 3), os intervalos QT e QTc, quando avaliados *in vivo*, apresentaram uma diminuição de duração nos animais treinados (TC e TD) quando comparado aos sedentários (SC e SD). A princípio, este achado indicaria uma redução no risco de morte súbita promovido pelo treinamento, cujo efeito não estaria sendo afetado pelo tratamento com o DECA. Porém, ao avaliar o mesmo parâmetro *in vitro* (tabela 4) foi observado que os animais tratados com anabolizante apresentaram um aumento na duração do intervalo QT, sugerindo que o tratamento com o DECA estaria promovendo distúrbios intrínsecos na repolarização ventricular, que associado aos efeitos negativos do anabolizante no sistema cardiovascular aumentaria o risco de morte súbita (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Wu, 1997; Bricout, 2000; Halvorsen et al, 2004). A discordância encontrada entre os resultados *in vivo* e *in vitro* sugere que os efeitos negativos do tratamento com DECA poderiam estar sendo acobertados na avaliação feita *in vivo* através de fatores endógenos como a modulação autonômica ou, talvez, pelo anestésico utilizado para avaliação do ECG *in vivo*.

A tabela 3 também mostrou o eixo elétrico ventricular dos quatro grupos experimentais. Constatamos que o mesmo não foi afetado tanto pelo treinamento quanto pelo tratamento com DECA. Sabe-se que o deslocamento do eixo elétrico ventricular pode indicar um aumento de massa muscular do VD ou do VE, dependendo para que lado do eixo o mesmo seja deslocado (Gyton & Hall, 1997). A hipertrofia ventricular pode ser uma adaptação fisiológica promovida por algumas modalidades de exercício (Weineck, 1991; Brion & Guérard, 2001), ou patológica, causada por algumas doenças (Gyton & Hall, 1997), treinamento excessivo (Weineck, 1991; Brion & Guérard, 2001) ou por drogas, como os anabolizantes (Sullivan et al, 1998; Woodiwiss et al, 2000; Brion & Guérard, 2001). Deste modo, os dados da tabela 3 sugerem que não houve alteração de massa muscular do VE em comparação a do VD, ou se houve, não foi suficiente para deslocar o eixo do coração dos animais no ECG, indicando que o aumento do peso do coração detectado nos animais SD e TD na tabela 1 deve ser resultante de uma hipertrofia proporcional do VD e do VE.

### **5.3. Efeitos do exercício e do tratamento com anabolizante sobre a função cardíaca e a tolerância ao evento de I/R *in vitro***

Baseado nos resultados apresentados na figura 13 foi constatado que o treinamento e o tratamento com DECA não interferiram na função contrátil cardíaca, ilustrada pela  $dP/dt+$ . Este resultado concorda com os resultados obtidos em um estudo feito com levantadores de peso (Thompson et al, 1992) e com outro feito com ratos (Starnes et al, 2005), nos quais o uso de esteróides anabólicos não alterou a função contrátil do coração. A função de relaxamento, avaliada através da  $dP/dt-$ , indicou que o tratamento com DECA prejudicou o relaxamento da musculatura ventricular esquerda nos animais SD, concordando com relatos de disfunção diastólica encontrada em levantadores de peso que faziam uso de altas doses de anabolizante (Kindermann, 2006; Notting et al, 2006). Este achado foi importante, pois indica que as doses utilizadas em nosso estudo foram capazes de promover alguns dos efeitos deletérios descritos com o uso abusivo de anabolizantes.

A tolerância ao insulto de I/R foi outro parâmetro avaliado através do estudo do coração isolado (*in vitro*). A tabela 5 mostrou que a isquemia levou à contratatura cardíaca caracterizada pela maior pressão diastólica (PD), que foi agravada no período de reperfusão nos quatro grupos experimentais. A PD encontrada no período da reperfusão não está correlacionado com a recuperação da pressão do VE (%PDVE – figura 14), nem com as lesões teciduais (figura 15) encontradas em nossos experimentos de I/R, tendo em vista que o exercício foi capaz de amenizar a disfunção contrátil e as injúrias isquêmicas (figuras 14 e 15), mas não a disfunção diastólica (tabela 5). A contratatura cardíaca proveniente do evento de I/R pode ter resultado de alterações no metabolismo celular tais como a depleção do ATP e o aumento dos níveis do íon cálcio intracelular (Ferrari et al, 1986a; Ferrari et al, 1986b; Steenbergen et al, 1990; Gustafsson & Gottlieb, 2008). A disfunção da maquinaria contrátil cardíaca é observada principalmente em isquemias severas, com duração acima de 30 minutos (Ferrari et al, 1986). Além disso, foi mostrado que pode ser amenizada pelo condicionamento isquêmico (Szenczi et al, 2005), pelo exercício (Brown et al, 2003; Hwang et al, 2005) e pelo tratamento com inibidores do transportador de cálcio e do trocador sódio-cálcio (Gustafsson & Gottlieb, 2008), ressaltando a importância do cálcio nas disfunções geradas pela I/R.

O comportamento da função contrátil e a área de infarto pós I/R foram mostrados nas figuras 14 e 15, respectivamente. Concordando com os resultados de trabalhos anteriores, os animais treinados apresentaram melhor recuperação da função contrátil (%PDVE - figura 14) e menor área de infarto (figura 15) que os animais sedentários (Powers et al., 1993; Libonati et al., 1997; Powers et al., 1998; Demirel et al., 2001; Hamilton et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Brown et al., 2003; Hamilton et al., 2003). Os mecanismos que promovem a cardioproteção são complexos e ainda são alvo de discussões, apontando para um somatório de alterações que podem envolver a ativação de cascatas de sinalização celular, e.g. via da PKC (Yamashita et al, 2001) e AMPc (Du Toit & Opie, 1992), melhora da capacidade antioxidante do miocárdio (Powers et al., 1993; Pereira, 1994; Hamilton et al., 2003; Chaves, EA, 2006 – ANEXO 1), indução de proteínas de choque térmico (HSP) (Benjamin & McMillan, 1998; Latchman, 2001), melhora da circulação colateral (cuja influência não foi relevante no presente trabalho tendo em vista a utilização de protocolo de isquemia global e não regional - McElroy et al.,

1978; Powers, 2003), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais (Starnes et al, 2007), conteúdo de metabólitos energéticos como a fosfocreatina e o ATP (Bowles et al., 1992) e abertura do canal de potássio sensível a ATP (Dos Santos et al, 2002; Da Silva et al, 2003).

Apesar da vasta literatura acerca do tópico cardioproteção e exercício, pouco se sabe sobre os efeitos do tratamento com anabolizante no insulto de I/R. Deste modo, um dos principais resultados do presente trabalho encontra-se nas figuras 14 e 15, onde foi mostrado que os animais treinados tratados com anabolizante (grupo TD) apresentaram menor recuperação da função contrátil (figura 14) e maior lesão no tecido cardíaco (figura 15) quando comparados aos animais do grupo TC. Este dado se correlaciona com informações da literatura mostrando uma maior incidência de doenças cardíacas em usuários de EA (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Wu, 1997; Bricout, 2000; Shahidi, 2001). Dentre as disfunções descritas pelo uso abusivo dos EA foram encontrados aterosclerose, formação de trombos, vasoespasmos (provenientes de alteração no metabolismo do NO) e lesões diretas nas células miocárdicas (Paavonen, 1994; Ajayi et al., 1995; Melchert & Welder, 1995; American and Academy of Pediatrics, 1997; Dickerman et al., 1997; Wu, 1997; Bricout, 2000; Shahidi, 2001), que são achados que poderiam agravar as lesões geradas pelo insulto de I/R. Sabe-se também que a testosterona, que é a molécula que deu origem aos esteróides anabólicos (EA), é capaz de alterar o balanço redox, tendo sido demonstrado aumento de estresse oxidativo tecidual no fígado (Pey et al, 2003) e em rins de ratos (Iliescu et al, 2007). Embora tenhamos encontrado uma vasta literatura sobre os efeitos deletérios dos EA no sistema cardiovascular, houve um único estudo que associou os efeitos do exercício físico a suplementação com anabolizante no contexto do insulto de I/R. No referido trabalho, os animais treinados tratados com laurato de nandrolona apresentaram menor valor de função contrátil que os ratos do grupo treinados controle pós I/R (Du Toit et al, 2005). Segundo os autores, o aumento nos níveis do TNF $\alpha$  e do AMPc nos corações dos animais sedentários tratados com anabolizante explicariam a menor tolerância a isquemia. Apesar dos níveis de ambas moléculas não terem sido avaliados nos ratos treinados, foi postulado que a perda da cardioproteção encontrada nos mesmos dever-se-ia a este mecanismo. O fundamento para tal conclusão se baseia em relatos da literatura que mostraram

que camundongos cujo o gene do TNF $\alpha$  foi deletado apresentaram maior resistência ao insulto de I/R (Maekawa et al, 2002) e que o aumento dos níveis de AMPc durante a isquemia agravaram os danos promovidos pela I/R através do aumento dos níveis de Ca<sup>+2</sup> citossólico (Du Toit & Opie, 1992).

#### **5.4. Mecanismos cardioprotetores**

##### **5.4.1 Enzimas antioxidantes e tióis**

Dentre os mecanismos cardioprotetores mencionados anteriormente, decidimos por investigar a influência do nosso modelo de exercício e de tratamento com DECA na atividade das enzimas antioxidantes e de algumas enzimas do metabolismo energético durante o insulto de I/R.

A influência da atividade física na capacidade antioxidante tecidual tem sido investigada exaustivamente. Foi proposto que o exercício induziria um estresse oxidativo tecidual intermitente (Davies et al, 1982a; Davies et al, 1982b; Alessio & Goldfarb, 1988; Sen, 1995, Kramer et al, 2007) resultando em um aumento na capacidade antioxidante em diferentes tecidos (Atalay & Sen, 1999; apud Ji, 2002). O estresse oxidativo gerado pelo exercício ocorre como consequência do aumento do consumo de oxigênio no músculo exercitado (Dröge, 2001; Kramer et al, 2007) e da atividade da xantina oxidase acarretada pela grande quantidade ATP hidrolisada pela atividade muscular (Heunks et al, 1999). Foi mostrado que músculos exercitados apresentaram uma maior produção de ROS em comparação aos em estado de repouso (Bejma & Ji, 1999), aumento nos níveis de glutathiona oxidada e de produtos de peroxidação lipídica circulantes (Laaksonen et al, 1999). Reforçando a relação entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes no exercício, Goldfarb et al (1996) mostraram que o exercício agudo promoveu um aumento na atividade da catalase, que foi amenizada pela suplementação com vitamina E, sugerindo que o aumento desta defesa antioxidante não enzimática estaria reduzindo o estresse oxidativo induzido pela atividade física e conseqüentemente amenizando o estímulo para o aumento da atividade da catalase. Ohkuwa et al (1997) relataram que uma sessão curta de exercício promoveu aumento no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no coração. Segundo os autores, esse aumento seria resultante de um

efluxo de GSH hepática induzida pela atividade física, apontando para a importância dos níveis de GSH hepáticos no exercício. As defesas antioxidantes também parecem ser capazes de interferir no desempenho obtido no exercício. Sen et al (1994) mostraram que ratos com deficiência nos níveis de glutatona celular obtiveram menor rendimento durante o exercício, sugerindo que o incremento das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas atuaria não só como uma adaptação ao estresse oxidativo proveniente do exercício, mas também como regulador determinante da performance (Sen et al, 1994).

O exercício, principalmente de média e de alta intensidade, quando praticado com regularidade, resulta em adaptações como aumento da expressão das enzimas antioxidantes (Ji, 2002; Kramer et al, 2007) e aumento da longevidade (Navarro et al, 2004). Os dados descritos nas figuras 16-20 concordam com vários relatos da literatura (Powers et al., 1993; Husain & Somani, 1997; Atalay & Sen, 1999; Ji, 2002; Hamilton et al., 2003; Kramer et al, 2007), sugerindo que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes encontrados em nosso estudo seria resultante do estresse oxidativo intermitente, promovido pelo exercício. Baseado em estudos como o de Ramires & Ji (2001), a menor lesão encontrada nos animais TC frente ao insulto de I/R (figura 14 e 15) poderia ser explicada pela maior atividade da SOD e da GPx (figura 16) e pela manutenção dos níveis de tióis durante o evento de I/R (figura 21) quando comparado aos demais grupos. Segundo Ramires & Ji (2001), tanto o treinamento quanto o treinamento associado à suplementação oral com GSH promoveram maior tolerância à isquemia e aumento da atividade das enzimas antioxidantes. A maior atividade das enzimas antioxidantes encontrada no grupo TC podem estar envolvidas com a ativação de vias de sinalização e de fatores de transcrição, como o HSF-1, a MAPK, o NF- $\kappa$ B e o AP-1 (Ji, 2002; Sen et al, 1994; Sen, 1995; Ji, 2002; Kramer et al, 2007). Foi mostrado que o gene de enzimas antioxidantes, como a MnSOD e a  $\gamma$ -glutamil sisteína sintetase, possuem sítios de ligação nas suas regiões promotoras para fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e o AP-1, onde estes poderiam se ligar, resultando em maior expressão destas enzimas (Ji, 2002; Kramer et al, 2007). Hollander et al (2001) investigaram a resposta de uma única sessão de exercício na expressão do gene da MnSOD em músculo esquelético de rato. Utilizando a técnica de binding, constataram que a ligação do NF- $\kappa$ B e do AP-1 aumentaram após o exercício agudo, sendo detectado

concomitante aumento da expressão de RNAm da MnSOD. O aumento do NF- $\kappa$ B persistiu por cerca de 48 horas, onde também foi detectado aumento nos níveis protéicos de MnSOD, enquanto o do AP-1 apresentou pico em 30 minutos com conseqüente retorno aos valores basais em questão de horas. Do mesmo modo, o aumento do peróxido de hidrogênio induzido pelo exercício ativou a MAPK em células de músculo esquelético de forma dose e tempo dependente (Kramer et al, 2007). Apesar dos efeitos positivos, a ativação crônica de algumas destas vias, como a via do NF- $\kappa$ B, está envolvida com doenças ligadas a distúrbios metabólicos e de degeneração tecidual, alertando para a diferença e importância da estimulação intermitente encontrada no treinamento (Ji et al, 2004; Ji, 2002; Kramer et al, 2007). Embora o exercício tenha promovido aumento da regulação de transcrição das enzimas antioxidantes e conseqüentemente, de suas atividades, o aumento da atividade destas parece não ocorrer somente por tal mecanismo. Trabalhos como o de Somani et al (1995), mostraram que o aumento da atividade da SOD, GPx e catalase induzidos pelo exercício foram maiores que os respectivos aumentos nos conteúdos dos RNAm, sugerindo que o exercício também poderia ativar fatores que contribuiriam para o aumento da atividade catalítica destas enzimas.

Como observamos na figura 16, os efeitos do exercício na atividade das enzimas antioxidantes foram impedidos ou revertidos pelo tratamento com DECA. Não foram encontrados relatos na literatura a respeito da regulação das enzimas antioxidantes por esteróides anabólicos em coração, mas há evidências de que elas são reguladas de formas diferenciadas, dependendo do tecido. Em macrófagos, por exemplo, ratos machos apresentaram menor atividade das enzimas antioxidantes quando comparados às fêmeas (Azevedo et al, 2001). Pansarasa et al (2002) por sua vez, mostraram que a administração de proprionato de testosterona promoveu aumento do estresse oxidativo tecidual, além de aumento da atividade da MnSOD, em músculo esquelético de ratos sedentários. O treinamento foi capaz de reduzir o estresse oxidativo basal muscular e aumentou a atividade da MnSOD. O efeito do treinamento na atividade da MnSOD foi inibido pelo tratamento com a testosterona, através de mecanismos desconhecidos até aquele momento. Em fígado, o tratamento com esteróides anabólicos promoveu maior estresse oxidativo tecidual, constatado através dos níveis aumentados de produtos de peroxidação lipídica (como os

TBARS), e aumento da atividade da SOD, catalase e GPx. Segundo os autores, o tratamento com anabolizante estaria promovendo um estresse oxidativo contínuo, ativando cascatas de sinalização sensíveis ao estado redox, resultando no aumento da expressão das enzimas antioxidantes (Pey et al, 2003). Como no nosso estudo não encontramos diferenças no conteúdo de tióis (figura 21) durante o período controle, aparentemente podemos descartar a hipótese do estresse oxidativo crônico. Uma hipótese para os resultados encontrados figura 16 seria que a resposta de aumento da atividade das enzimas anitoxidantes promovida pelo estresse oxidativo moderado induzido pelo exercício estaria sendo afetada pelo uso de altas doses de anabolizante. Neste contexto, Norata et al (2006) mostraram que a dehidroepiandrosterona (DHEA), que é um hormônio precursor da testosterona, foi capaz de diminuir a resposta inflamatória induzida pelo TNF- $\alpha$  em células endoteliais. Do mesmo modo, Iwasaki et al (2004) encontraram que a DHEA, preveniu a ativação do AP-1 induzida pelo TNF- $\alpha$ , e também a ativação do NF- $\kappa$ B estimulada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Segundo os autores, os efeitos da DHEA seriam mediados, ao menos em parte, pela eliminação do estresse oxidativo produzido pela ativação de citocinas, como o TNF- $\alpha$  em hepatócitos. Avaliando mais especificamente os efeitos da testosterona em células endoteliais aórticas, Katakeyama et al (2002) revelaram que este hormônio foi capaz de inibir a ativação transcricional do NF- $\kappa$ B induzida pelo TNF- $\alpha$ , possivelmente através da supressão da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B. Neste contexto, os resultados da figura 16 sugerem que o DECA poderia estar amenizando o estresse oxidativo promovido pelo exercício, impedindo que fatores transcricionais como o NF- $\kappa$ B e o AP-1 fossem ativados, estimulando a transcrição gênica das enzimas antioxidantes, resultando nas atividades mais baixas da SOD e da GPx encontradas no grupo TD. Apesar dos efeitos do DECA que especulamos, durante o insulto de I/R, os níveis de DECA presentes no tecido cardíaco não seriam suficientes para impedir as injúrias provenientes do grande estresse oxidativo tecidual, acarretando na oxidação dos tióis e nas lesões similares a dos animais sedentários.

A importância do estresse oxidativo e do incremento das defesas antioxidantes teciduais sobre as injúrias geradas pelo evento de I/R é um ponto chave e controverso. Nas figuras 17-20, encontramos um aumento transitório na

atividade da maioria das enzimas antioxidantes durante o período de isquemia, sendo este revertido na reperfusão. Resultados semelhantes foram relatados por Arduini et al (1988), onde foram detectados aumentos na atividade das enzimas GPx e da GR no período da isquemia, porém, persistindo no período da reperfusão. Não foi encontrado um consenso a respeito da atividade da GPx durante a reperfusão, de modo que houveram relatos de aumento (Julicher et al, 1984), diminuição (Guarnieri et al, 1980; Shlafer et al, 1987; Meerson et al, 1982) ou ainda a não alteração (Ferrari et al, 1986). Divergências desta natureza podem ser resultantes dos diferentes modelos experimentais, protocolos de I/R e animais utilizados. Os trabalhos acerca da enzima SOD foram mais homogêneos. Foram relatadas diminuições da atividade desta enzima tanto no período de isquemia quanto no de reperfusão em diferentes modelos animais (Guarnieri et al, 1980; Ferrari et al, 1986; Shlafer et al, 1987; Arduini et al, 1988). Segundo Shlafer et al (1987), a diminuição da atividade da SOD e da GPx observada no insulto de I/R em alguns trabalhos poderia ser reflexo de uma inativação ou perda do conteúdo destas enzimas. Na presente tese, encontramos um aumento na atividade das enzimas antioxidantes no período de isquemia em praticamente todos os grupos (figura 17-20), sugerindo um mecanismo protetor do tecido cardíaco à isquemia, independente do exercício ou do tratamento com DECA. Devido ao curto tempo do protocolo de I/R e a relatos como os de Hollander et al (2001), mostrando que o conteúdo protéico de CuZnSOD apresentou aumento 10 horas após o exercício agudo e a MnSOD somente após 48 horas, não acreditamos que o aumento de atividade das enzimas antioxidantes durante a isquemia tenha sido causado por um aumento na expressão das mesmas. Embora o exercício submeta o tecido cardíaco a um estresse oxidativo mais ameno que o protocolo de I/R global, acreditamos que o tempo de 30 minutos de isquemia não seja suficiente para promover aumento no conteúdo protéico das enzimas antioxidantes. Esta suposição é reforçada visto que ao término da reperfusão as atividades das enzimas antioxidantes retornaram aos valores do período de controle, apontando para uma regulação específica da atividade e não do conteúdo destas enzimas. Dentre as hipóteses que poderiam explicar nossos resultados, destacamos o estudo de Kosenko et al (1997), que demonstrou que concentrações micromolares de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) exerceram um efeito estimulatório sobre a atividade da SOD em eritrócitos. De maneira semelhante, Tauler et al

(1999) tentaram mimetizar o estresse oxidativo de um exercício intenso *in vitro*, encubando eritrócitos hemolisados em um sistema xantina-xantina oxidase. Os resultados mostraram que em altas concentrações de eritrócitos a SOD presente nos mesmos foi capaz de dismutar todo o superóxido produzido pelo sistema xantina-xantina oxidase em  $H_2O_2$ . Neste caso, não foi observada a redução do citocromo c, nem alteração na atividade da catalase. Quando a concentração de eritrócitos hemolisados foi baixa, a SOD presente não foi capaz de dismutar todo o superóxido, de modo que o citocromo c passou a ser reduzido pelo superóxido, e coincidentemente, a atividade da catalase apresentou-se aumentada. Os autores sugeriram que a ativação da catalase estaria ligada à redução do íon ferro pelo ânion superóxido. Esta hipótese foi baseada no estudo de Hawkins et al (1993), onde mostraram que o sistema xantina-xantina oxidase, que foi usado para reduzir o íon ferro (de  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$ ), aumentou o potencial gerador do radical hidroxil. Levando-se em consideração que o citocromo c é uma hemoproteína e a catalase também, é possível que o  $Fe^{3+}$  presente em sua estrutura tenha sido reduzido em  $Fe^{2+}$  aumentando a taxa de decomposição do  $H_2O_2$  desta enzima (Tauler et al, 1999). Reforçando estes achados, foi mostrado que o óxido nítrico seria capaz de inibir a atividade da catalase através da oxidação do ferro presente nesta hemoproteína, produzindo nitrato e heme férrico (Wolin et al, 1998; Cooper, 1999).

Os grupamentos tióis são compostos por várias substâncias e representam uma das mais importantes defesas antioxidantes não enzimáticas. Através dos seus níveis e da razão entre o estado reduzido e oxidados regulam várias funções celulares como permeabilidade de membrana, transporte iônico, atividade de ATPases e apoptose (Wang & Bellatori, 1998; Davis et al, 2001). Na mitocôndria, por exemplo, a glutathiona, que é um tiol, representa uma das mais importantes defesas antioxidantes não enzimáticas. Apesar disso, a mitocôndria não possui enzimas responsáveis pela produção de glutathiona, de modo que os níveis deste tiol no estado reduzido dependem exclusivamente da reciclagem promovida pela GR ou pela importação da mesma do citossol da célula (Fernandez-Checa, 2005). Em condições normais, em células de mamíferos, cerca de 98% da glutathiona é mantida no estado reduzido (Wang & Bellatori, 1998). Em caso de estresse oxidativo severo, como o induzido pelo evento de I/R, ou onde a GR apresente uma redução em sua atividade, a glutathiona passa a permanecer em um estado

oxidado, possibilitando que as ROS interajam com diversas estruturas da célula, como proteínas de membrana e enzimas, danificando-as e levando, em última instância, a morte celular (Wang & Bellatori, 1998; Davis et al, 2001). Os efeitos do exercício nas defesas antioxidantes não enzimáticas e sua importância na I/R é um tópico importante. Na figura 21 o conteúdo de tióis no período do controle mostrou que o exercício, tampouco o tratamento com DECA, interferiram no conteúdo das defesas antioxidantes não enzimáticas teciduais. Estes resultados concordam com os outros autores, onde o exercício não alterou os níveis de glutathiona do coração (Leeuwenburgh et al, 1997; Ramires & Ji, 2001; Lennon et al, 2004). Apesar disto, também encontramos trabalhos onde o treinamento induziu aumentos nos níveis de glutathiona citossólica (Somani et al, 1995) e nos níveis basais de tióis (Powers et al, 1998; Hamilton et al, 2001) ou ainda diminuição da razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (Leeuwenburgh et al, 1997) em corações, alertando para o impacto dos diferentes tipos de protocolos de treinamento e de modelos experimentais nas adaptações induzidas pelo exercício. Ao avaliarmos os níveis dos tióis no decorrer da I/R, observamos que os animais SC, SD e TD apresentaram diminuição significativa dos níveis destas substâncias ao término da reperfusão. Este dado concorda com resultados de trabalhos anteriores, onde o evento de I/R promoveu progressiva diminuição dos níveis da GSH, aumento da GSSG (Arduini et al, 1988), aumento na peroxidação lipídica e diminuição no conteúdo de ácido ascórbico (Tavazzi et al, 1992), refletindo o grande estresse oxidativo desencadeado pela I/R nos corações de animais sedentários. O exercício parece amenizar este quadro de estresse oxidativo, apesar de haver um estudo que mostrou que corações de ratos sedentários e treinados apresentaram lesão tecidual e estresse oxidativo similares no decorrer do insulto de I/R (Ramires & Ji, 2001). Em corações de animais treinados, a diminuição do estresse oxidativo tecidual tem sido caracterizada por relatos como uma menor peroxidação lipídica (Powers et al, 1998), maior conteúdo de tióis (Hamilton et al, 2001) e menor depleção de glutathiona (Ji et al, 1994) durante o evento de I/R. Os nossos resultados reforçaram a idéia do menor estresse oxidativo promovido pelo treinamento, de modo que os animais TC não apresentaram alterações nos níveis dos tióis durante o insulto de I/R (figura 21). Esta proteção pode ser um reflexo do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (figura 16), concordando com os resultados de trabalhos como o de

Powers et al (1998) e Hamilton et al (2001). Assim, as ROS produzidas durante a I/R estariam sendo detoxificadas em espécies não reativas, impedindo a oxidação dos tióis e de estruturas celulares, refletindo em uma menor lesão ao término do período de reperfusão. Os ratos TD apresentaram uma diminuição do conteúdo de tióis ao término do insulto de I/R, sugerindo que a menor atividade da SOD, GPx e GR do coração destes animais estaria permitindo um maior estresse oxidativo tecidual, resultando na oxidação dos tióis, e possivelmente de estruturas celulares, explicando a perda da cardioproteção encontrada no grupo TD.

#### 5.4.2 Enzimas do metabolismo energético

Em condições de normóxia, 60-90% do substrato energético do tecido cardíaco advém da oxidação de ácidos graxos livres, enquanto apenas 10-40% é proveniente do metabolismo de carboidratos. Durante condições de hipóxia severa do miocárdio, o metabolismo oxidativo encontra-se prejudicado pela escassez de O<sub>2</sub>, acarretando em uma maior solicitação e utilização do ATP advindo de metabolismo anaeróbico (glicolítico) (Lee et al, 2004). Em isquemias severas, onde não há fluxo sanguíneo, ou no nosso caso, de solução de Krebs, o músculo cardíaco pode tornar-se totalmente dependente do metabolismo anaeróbico e de seus substratos endógenos, como o fosfato de creatina e o glicogênio. Dependendo da duração da isquemia, o metabolismo oxidativo encontrar-se-á totalmente suprimido pela escassez severa de O<sub>2</sub>. Como o piruvato resultante do metabolismo anaeróbico não consegue mais ser utilizado pelas enzimas do ciclo de Krebs, este passa a ser consumido majoritariamente pela enzima lactato desidrogenase (LDH), acarretando em um acúmulo de lactato e diminuição do pH no citossol da célula. A acidose induzida pela isquemia promove uma redução progressiva do metabolismo glicolítico, através da inibição de enzimas chave como a fosfofrutocinase (Stanley et al, 1997; Dhalla et al, 2000; Lee et al, 2004). A diminuição progressiva dos níveis de ATP encontrado durante a isquemia prejudica o funcionamento celular progressivamente, levando à diminuição da atividade de importantes ATPases e conseqüente perda do potencial de membrana, acúmulo do íon Na<sup>+</sup> e do íon Ca<sup>2+</sup> e aumento do estresse oxidativo no citossol da célula (Dhalla et al, 2000; Lee et al, 2004). Durante a reperfusão, o acúmulo de metabólitos como a hipoxantina e a xantina, agravam o

estresse oxidativo iniciado na isquemia, através do superóxido e do peróxido de hidrogênio produzidos pela reação da enzima xantina oxidase (Dröge, 2002).

A atividade da HK, avaliada durante o insulto de I/R, apresentou aumento no período de isquemia nos ratos treinados quando comparados aos demais grupos (figura 22). O mecanismo responsável por este resultado não pode ser atribuído a um aumento na expressão protéica desta enzima através da ativação do fator de transcrição HIF-1 pela isquemia, pois a enzima lactato desidrogenase (LDH), cuja transcrição também é regulada pelo HIF-1 (Semenza, 2000a) não apresentou aumento em nenhum dos grupos experimentais durante a isquemia (figura 23). Dado semelhante ao nosso foi relatado por Knull et al (1973), onde isquemias curtas foram capazes de aumentar a atividade da HK de cérebro de galinha, através de mecanismos que não foram elucidados. Acreditamos que o aumento da atividade da HK nos ratos treinados possa estar ligado a uma regulação rápida talvez ligada ao aumento do estresse oxidativo tecidual encontrado durante a isquemia.

Tentando compreender a importância do aumento da atividade da HK encontrada nos animais treinados durante a isquemia (figura 22) com a cardioproteção induzida pelo exercício, encontramos um trabalho mostrando que a superexpressão da enzima HK em células renais preveniu a apoptose induzida pelo estresse oxidativo agudo (Bryson et al, 2002). Neste contexto, formulamos a hipótese da HK estar auxiliando a atividade das enzimas antioxidantes. O aumento da atividade da HK implicaria em maior concentração de glicose-6-fosfato citossólica, que poderia ser utilizada tanto pelo metabolismo glicolítico quanto pela via das pentoses. Durante situações como a I/R, há aumento dos níveis de NADP, que favorece a oxidação da glicose 6-fosfato pela glicose-6-fosfato dehidrogenase na via das pentoses, acarretando na concomitante redução do NADP em NADPH. Como comentado anteriormente, o NADPH é um substrato essencial para a atividade da enzima GR, que através da redução da GSSG contribui tanto para a manutenção dos níveis de GSH celular, quanto para a atividade da enzima antioxidante GPx. Sabe-se que parte dos danos promovidos pelo insulto de I/R se deve ao aumento dos níveis de ROS como o  $H_2O_2$ , sendo que as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas exercem um papel determinante destas injúrias (Halliwell & Gutteridge, 2007). Foi mostrado que tanto a depleção de GSH (Singh et al, 1989; Werns et al, 1992) quanto de glicose 6-

fosfato desidrogenase (Jain et al, 2004) agravaram os danos gerados pelo insulto de I/R, assim como a suplementação com GSH aumentou a tolerância do tecido cardíaco a este insulto (Singh et al, 1989; Ferrari et al, 1991). Além disso, há aumento da atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase de tecido cardíaco quando o mesmo é submetido a estresse oxidativo (Zimmer et al, 1981; Jain et al, 2003), indicando a correlação entre a atividade desta enzima, os níveis de GSH e as lesões geradas pela I/R. Tendo em vista estes achados, a hipótese da enzima HK estar auxiliando a atividade das enzimas antioxidantes nos animais treinados durante a isquemia e principalmente durante o início da reperfusão é bastante plausível.

Ressaltando a importância da atividade da HK na prevenção das lesões induzidas pelo insulto de I/R, foi mostrado que a isoforma citosólica da HK pode ser translocada para a mitocôndria durante o estresse de isquemia, aumentando em cerca de 4 vezes a sua ligação a esta organela (Southworth et al, 2007) e que o ADP produzido pela atividade da HK em cérebro de ratos foi capaz de diminuir a geração de ROS mitocondrial neste tecido (Da-Silva et al, 2004). Deste modo, o ADP resultante da atividade da HK poderia atuar prevenindo a geração de ROS mitocondrial principalmente durante a reperfusão, diminuindo o estresse oxidativo tecidual e contribuindo conseqüentemente para a manutenção dos níveis de tióis, como encontrado nos animais treinados durante a I/R (figura 21). Outra possibilidade que correlacionaria a cardioproteção encontrada no grupo TC com o respectivo aumento da atividade da HK envolveria a maior atividade do metabolismo glicolítico durante a isquemia, onde a glicólise desempenha um papel importante na ressíntese de ATP da célula cardíaca (Stanley et al, 1997). Deste modo a diminuição dos níveis de ATP celular comumente relatado durante a isquemia seria amenizado, levando a menor redução na atividade das ATPases presentes nas células miocárdicas e, conseqüentemente em menor disfunção celular proveniente da perda do potencial de membrana celular e da sobrecarga de  $Ca^{2+}$  citossólica.

A atividade da enzima LDH perante o insulto de I/R foi mostrada na figura 23. O objetivo inicial da avaliação desta enzima foi averiguar se o HIF-1 estaria sendo ativado pelo evento de I/R, tendo em vista que tanto a transcrição da enzima LDH quanto da HK são reguladas pelo HIF-1 (Semenza, 2000a). Como não foi observado aumento da atividade desta enzima em nenhum dos grupos

experimentais, sugerimos que o HIF-1 não foi ativado ou não teve tempo suficiente para modular a expressão desta enzima durante o protocolo de I/R, e, portanto não pode ter sido responsável pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes e da HK observado durante a isquemia (figuras 17-20, 22). Os animais SC e SD apresentaram uma diminuição progressiva da atividade da enzima LDH durante a I/R. Esta alteração encontrada nos corações dos animais sedentários foi independente do tratamento com anabolizante e parece ter sido impedida pelo treinamento (figura 23). Durante os eventos de I/R é comum encontrar relatos associando lesões teciduais à liberação da enzima LDH no efluente de corações (Bricknell & Opie, 1978; Zhang et al, 2007). A liberação da enzima LDH parece estar relacionada com a contração da musculatura cardíaca encontrada na isquemia, devido ao baixo fluxo coronário, de modo que a enzima perdida pelas células injuriadas ficaria alojada no espaço intersticial até o momento da reperfusão, sendo liberada no efluente (Bricknell & Opie, 1978). Como a atividade da LDH não foi avaliada no efluente, podemos apenas sugerir que a diminuição da atividade encontrada nos animais sedentários (figura 23) seja resultante da perda de conteúdo de LDH tecidual durante a I/R, reforçando os dados de lesão tecidual encontrados nestes animais (figuras 14 e 15).

Outra enzima avaliada durante o insulto de I/R foi a CS. Dependendo do animal, do tipo e intensidade do exercício a atividade da CS do tecido cardíaco pode não sofrer alteração (Powers et al, 1998; Delgado et al, 1999) ou apresentar aumento (Hinken et al, 2006). O aumento da atividade da CS induzida pelo exercício tem sido relacionado a uma melhora do metabolismo oxidativo (McAllister et al, 1997), que pode ser resultante de um aumento do conteúdo de mitocôndrias. Na presente tese não foram encontradas alterações na atividade da CS (figura 24) entre os quatro grupos experimentais em nenhum dos períodos experimentais (controle, isquemia e reperfusão), sugerindo que tanto o treinamento quanto o uso com DECA não estariam estimulando aumentos no conteúdo de mitocôndrias do tecido ventricular cardíaco.

Na figura 25 avaliamos a atividade de transferência de elétrons do complexo I ao III da cadeia transportadora de elétrons (CI-III) durante a I/R. Revisando a literatura, encontramos que a inibição da atividade do complexo I ou do complexo III está associada a um aumento na produção de ROS (Turrens, 2003). Do mesmo modo, vários trabalhos relataram que tanto a isquemia quanto a

reperfusão promoveram um aumento na produção de ROS em mitocôndrias de coração (Davies, 1989; Ueta et al, 1990; Li & Jackson, 2002). A maior produção de ROS encontrada na reperfusão, quando associada a sobrecarga do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , poderia culminar no inchamento da mitocôndria, com conseqüente ruptura das membranas e perda das funções mitocondriais levando a morte celular (Li & Jackson, 2002). No período do controle e da reperfusão, não foram encontradas diferenças na atividade do CI-III entre os grupos. Na isquemia foi observado um aumento da atividade do CI-III nos corações dos ratos TC. Este resultado corrobora com o aumento da HK encontrado na figura 22 e sugere uma maior capacidade de ressíntese de ATP através do metabolismo glicolítico e do oxidativo durante a isquemia e possivelmente durante os primeiros minutos da reperfusão nos animais treinados, levando em consideração que nos ensaios de atividade do CI-III havia substrato e oxigênio no meio de reação. Como a isoforma citossólica da enzima KH parece ser translocada para a mitocôndria durante a isquemia (Southworth et al, 2007), no início da reperfusão esta enzima poderia fornecer o ADP necessário para a atividade da ATP sintase, contribuindo para um fluxo contínuo de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória, acarretando em uma menor produção de ROS mitocondrial no início da reperfusão (Boveris et al, 1972; Paraidathathu et al, 1992; Turrens, 2003). O mecanismo pelo qual o exercício permitiu a regulação transitória da atividade do CI-CIII durante a isquemia e como o DECA interferiu nessa resposta ainda é obscuro, sendo necessário mais estudos no futuro tentando elucidar estes achados.

## 6. CONCLUSÕES

O treinamento físico promoveu maior tolerância do tecido ventricular cardíaco ao insulto da isquemia/reperfusão (I/R). Esta proteção caracterizou-se por uma melhor recuperação da função contrátil pós-isquemia, associada a uma menor área de infarto ao final da reperfusão.

Os mecanismos responsáveis pela cardioproteção encontrados nos ratos TC são complexos, envolvendo o aumento da atividade antioxidante enzimática, representada pelas enzimas SOD, GPx e GR, e possivelmente pela atividade da enzima HK no período da isquemia. Além disso, a maior atividade da HK e do complexo I-III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial durante o período da isquemia, sugerem um melhor aporte energético e possível diminuição da produção de ROS pela mitocôndria neste período. Estas alterações enzimáticas resultariam na manutenção dos níveis de tióis durante a I/R e na menor lesão tecidual encontrados ao término da reperfusão no grupo TC.

A ativação dos mecanismos cardioprotetores induzidos pelo exercício foi prejudicada pelo tratamento com altas doses de decanoato de nandrolona (DECA) nos animais exercitados (TD). A perda da cardioproteção foi caracterizada tanto pela reduzida recuperação da função contrátil, quanto pelo maior tamanho da área infartada, apresentando valores semelhantes aos encontrados nos animais do grupo sedentário controle (SC).

Com os resultados do presente trabalho concluímos que a cardioproteção induzida pelo exercício está envolvida com a diminuição do estresse oxidativo tecidual, associado, possivelmente, a um melhor aporte energético e menor produção de ROS mitocondrial na isquemia e principalmente no início do período de reperfusão. Ressaltamos a necessidade de estudos mais focados no metabolismo mitocondrial, visando confirmar a hipótese de menor produção de ROS e melhor aporte energético no início da reperfusão, além da influência de outros mecanismos protetores ativados nesta organela, como o canal de  $K_{ATP}$ , que não foi o foco do presente trabalho. Os mecanismos cardioprotetores encontraram-se prejudicados nos animais treinados tratados com anabolizante, explicando de forma elegante a maior lesão encontrada nestes ratos. Devido à falta de informações sobre o tema abordado nesta tese, alertamos para a necessidade de futuros estudos buscando

compreender de forma mais ampla a interação entre cardioproteção, exercício e anabolizante.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126, 1984.
- AJAYI, AAL; MATHUR, R & HALUSHKA, V. Testosterone Increases Human Platelet Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor Density and Aggregation Responses. *Circulation* 91(11):2741-47, 1995.
- ALESSIO, HM & GOLDFARB, AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *Journal of Applied Physiology* 64:1333-6, 1988.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, Comitee on Sports Medicine and Fitness. Adolescents and Anabolic Steroids: A subject review. *Pediatrics* 99(6):904-8, 1997.
- APPELL, HJ; HELLER-UMPFENBACH, B; FERAUDI, M & WEICKER, H. Ultrastructural and morphometric investigations on the effects of training and administration of anabolic steroids on the myocardium of guinea pigs. *International Journal of Sports Medicine* 4(4):268-74, 1983.
- ARDUINI, A; MEZZETTI, A; PORRECA, E et al. Effects of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochemica et Biophysica Acta* 970:113-21, 1988.
- ATALAY, M & SEN, C. Physical exercise and antioxidant defenses in the heart. *874:169-77, 1999.*
- AVKIRAN, M & MARBER, MS. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Inhibitors for Cardioprotective Therapy: Progress, Problems and Prospects. *Journal of the American College of Cardiology* 39:747-53, 2002.
- AZEVEDO, RB; LACAVA, ZGM, MIYASAKA, CK et al. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rats macrophages by sex steroids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 334:683-7, 2001.
- BEJMA, J & JI, LL. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 87:465-70, 1999.
- BENJAMIN, IJ & CHRISTIANS, E. Exercise, estrogen, and Ischemic cardioprotection by heat shock protein 70. *Circulation Research* 90:833-5, 2002.
- BENJAMIN, IL & MCMILLAN, DR. Stress (heat shock) proteins – Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 83:117-32, 1998.

- BERLIN, JA & COLDITZ, G. A metaanalysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology* 132: 612-28, 1990.
- BERRY, CE & HARE, JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology* 555:589-606, 2004.
- BHASIN, S; STORER, TW; BERMAN, N et al.. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *The New England Journal of Medicine* 335(1):1-7, 1996.
- BILOLO, G. Can we increase protein synthesis by anabolic factors? *American Journal of Kidney Disease* 37(1 Suppl 2): S115-8, 2001.
- BLOM, M; JANSZKY, I; BALOG, P et al.. Social relations in women with coronary heart disease: the effects of work and marital stress. *Journal of Cardiovascular Risk* 10:201-6, 2003.
- BOLLI, R. The late phase of preconditioning. *Circulation Research* 87:972-83, 2000.
- BOVERIS, A; OSHINO, N & CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* 128(3):617-30, 1972.
- BOWLES, DK; FARRAR, RP & STARNES, W. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology* 263(32):H804-9, 1992.
- BOWLES, DK; LAUGHLIN, MH & STUREK, M. Exercise training alters the Ca<sup>2+</sup> and contractile responses of coronary arteries to endothelin. *Journal of Applied Physiology* 78: 1079-87, 1995.
- BOWLES, DK & WAMHOFF, BR. Coronary smooth muscle adaptation to exercise: does it play a role in cardioprotection? *Acta Physiologica Scandinavica* 178:117-21, 2003.
- BOYCE, EG. Use and effectiveness of performance-enhancing substances. *Journal of Pharmacy Practice* 16:22-36, 2003.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254, 1976.
- BRANN, DW; HENDRY, LB & MAHESH, VB. Emerging Diversities in the mechanism actions of steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52(2):113-33, 1995.
- BRICKNELL, OL & OPIE, LH. Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated rat heart during underperfusion and on release of lactate

dehydrogenase and arrhythmias during reperfusion. *Circulation Research* 43:102-15, 1978.

- BRICOUT, VA. Mode d'action et effets physiologiques de la testostérone, ou de l'inutilité d'un apport d'anabolisants chez le sportif. *Science & Sports* 15:3-9, 2000.
- BRION, R & GUÉRARD, S. Ecocardiografia do atleta. In Amoretti, R & Brion, R. *Cardiologia do Esporte*. Editora Manole, SP, pág 55-65, 2001.
- BROEDER, CE; KA Burrhus, KA; LS Svanevik, LS et al. Assessing body composition before and after resistance or endurance training. *Medicine and Science in Sports Exercise* 29: 705 -12, 1997.
- BROWN, JM; TERADA, LS; GROSSO, MA et al. Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide wich contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated rat hearts. *Journal Clinical Investigation* 81:1297-301, 1988.
- BROWN, DA; JEW, KN; SPARAGNA, GC et al. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *Journal of Applied Physiology* 95:2510-8, 2003.
- BROWN, DA; LYNCH, JM; ARMSTRONG, CJ et al. Susceptibility of the heart to ischemia-reperfusion injury and exercise induced cardioprotection are sex-dependent in rats. *The Journal of Physiology* 564(2):619-30, 2005a.
- BROWN, DA; CHICCO, AJ; JEW, KW et al. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of  $K_{ATP}$  channel in the rat. *The Journal of Physiology* 569(3):913-24, 2005b.
- BRYSON, JM; COY, PE; GOTTLÖB, K et al. Increased Hexokinase Activity, of Either Ectopic or Endogenous Origin, Protects Renal Epithelial Cells against Acute Oxidant-induced Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry* 277:11392–400, 2002
- BURELLE, Y; WAMBOLT, RB; GREEST, M et al. Regular exercise is associated with protective metabolic phenotype in the rat heart. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 287:H1055-63, 2004.
- BURKETT, LN & FALDUTO MT. Steroid use by athletes in a metropolitan area. *Physician in Sportsmedicine* 12: 69-73, 1984.
- CAI, Z; Manalo, DJ; Wei, G; Rodriguez, RE et al. Hearts From Rodents Exposed to Intermittent Hypoxia or Erythropoietin Are Protected Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation* 108:79–85, 2003.
- CALBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. *Methods in Enzymology*. 113: 484-490, 1985.

- CAMM, AJ; WARD, DE & SPURRELL, RA. Gaps in anterograde conduction in patients with the short PR interval, normal QRS complex syndrome. *Heart* 40:1119–26, 1978.
- CARSON, LD & KORZICK, DH. Dose-dependent effects of acute exercise on PKC levels in rat heart: is PKC the heart's prophylactic? *Acta Physiologica Scandinavica* 178, 97-106, 2003.
- CELOTTI, F. & NEGRI, C. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of actions and their use in athletics. *Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43(5):469-77, 1992.
- CHAVES, EA; PEREIRA-JR, PP; FORTUNATO, RS et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 99:223-30, 2006.
- CHICCO, AJ; JOHNSON, MS; ARMSTRONG, CS et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel blockade in the rat heart. *American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 292: H2432-H2437, 2007.
- COOPER, CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411(2-3):290-309, 1999.
- COWAN, DA & KICMAN, AT. Doping in Sport: Misuse, Analytical Tests, and Legal Aspects. *Clinical Chemistry* 43(7):1110-2, 1997.
- CRAPO, J.D.; MC CORD, J.M.; FRIDOVICH I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*. 3: 382-393, 1977.
- DA SILVA, MM; SARTORI, A; BELISLE, E & KOWALTOWSKI, AJ. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases  $H_2O_2$  release, and enhances  $K^+$  transport. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 285:H154–62, 2003.
- DA-SILVA, WS; GOMEZ-PUYOU, A; GOMEZ-PUYOU, MT et al. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense – Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 279:39846-55, 2004.
- DAVIES, KJ; PACKER, L & BROOKS, GA. Exercise bioenergetics following sprint training. *Archives Biochemistry and Biophysics* 215:260-5, 1982a.
- DAVIES, KJ; QUINTANILHA, AT & BROOKS, GA. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 107:1198-205, 1982b.

- DAVIES, MJ. Direct detection of radical production in the ischaemic and reperfused myocardium: current status. *Free Radicals Research Communications* 7(3-6):275-84, 1989.
- DAVIES Jr.,W; RONAI, Z & TEW, KD. Cellular Thiols and Reactive Oxygen Species in Drug-induced Apoptosis. *Perspectives in Pharmacology* 296(1):1-6, 2001.
- DAVIS, W; RONAI, Z & TEW, KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296:1-6, 2001.
- DE MARIA, AN; NEUMANN, A; LEE, G et al.. Alterations in ventricular mass and performance induced by exercise training in men evaluated by echocardiography. *Circulation* 57:237-44, 1978.
- DELGADO, J; SABORIDO, A; MORÁN, M & MEGÍAS, A. Chronic and acute exercise do not alter  $Ca^{2+}$  regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. *Journal of Applied Physiology* 87:152-60, 1999.
- DEMIREL, HA; POWERS, SK; ZERGEROGLU, MA et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia- reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology* 91:2205-12, 2001.
- DHALLA, NS; ELMOSELHI, AB; HATA, T & MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 47: 446-56, 2000.
- DICKERMAN, RD; McCONATHY, WJ; SCHALLER, F & ZACHARIAH, NY. Echocardiography in fraternal twin bodybuilders with one abusing anabolic steroids. *Cardiology* 88:50-1, 1997.
- DOS SANTOS, P; KOWALTOWSKI, AJ; LACLAU, MN et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K channel protects the ischemic heart. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 283: H284–95, 2002.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82: 47-95, 2002.
- DU TOIT, EF & OPIE, LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in isolated rat heart by altering calcium flux at the onset of reperfusion. *Circulation Research* 70:960-7, 1992.
- DU TOIT, EF; ROSSOUW, E; VAN ROOYEN J & LOCHNER A. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Journal of South America* 16:21-8, 2005.

- FACUNDO, HTC; CARREIRA, RS; DE PAULA, JG et al. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K<sup>+</sup> channel activity. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 469-79, 2006.
- FERNANDEZ-CHECA, JC & KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204: 263– 273, 2005.
- FERRÁNDEZ, MD; FUENTE, M; FERNÁNDEZ, E & MANSO, R. Anabolic Steroids and Lymphocyte Function in sedentary and Exercise-trained Rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 59(2): 225-232, 1996.
- FERRARI, R; CECONI, C; CURELLO, S et al. Myocardial recovery during post-ischaemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium and magnesium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 18(5): 487-98, 1986a.
- FERRARI, R; CECONI, C; CURELLO, S et al. Intracellular effects of myocardial ischaemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. *European Heart Journal* 7: 3-12, 1986b.
- FERRARI, R; CECONI, C; CURELLO, S et al. Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *American Journal of Medicine* 91:95S–105S, 1991.
- FLOHÉ, L; GÜNZLER, W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology* 105 (1984)114-121.
- GAZVANI, MR; BUCKETT, W; LUCKAS, MJ et al.. Conservative management of azoospermia following steroid abuse. *Human Reproduction*, 12(8):1706-1708, 1997.
- GOLDFARB, AH; MCINTOSH, MK & BOYER, BT. Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. *Journal of Applied Physiology* 80(2):486-90, 1996.
- GONZÁLEZ, B; HERNANDO, R & MANSO, R. Anabolic steroid and gender-dependent modulation of cytosolic HSP70s in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74:63-71, 2000.
- GRANGER, DN; RUTILI, G & McCORD, J. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81:22-9, 1981.
- GRIFFIN, JE. Male Reproductive Function. Em GRIFFIN, JE & OJEDA, SR. *Textbook of Endocrine Physiology*. 4<sup>a</sup> edition, OXFORD University Press, pág 243-264, 2000.
- GRIGGS, R; KINGSTON, W; JOZEFOWIEZ, R et al.. Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *Journal of Applied Physiology* 66:498-503, 1989.

- GUARNIERI, C; FLAMIGNI, F & CALDARERA, CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 12(8):797-808, 1980.
- GUSTAFSSON, AB & GOTTLIEB, RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovascular Research* 77(2): 334-43, 2008.
- GUTSTEIN, DE; MORKEY, GE; TAMADDON, H et al. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin 43. *Circulation Research* 88:333-9, 2001.
- GUTTERIDGE, JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarker of Tissue Damage. *Clinical Chemistry* 41:1819-28, 1995.
- GYTON, AC & HALL, JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Guanabara Koogan – RJ, pág 121-133, 1997.
- HABSCHEID, W; ABELE, U & DAHM, HH. Severe cholestasis with kidney failure from anabolic steroids in a body builder. *Dtsch Med Wochenschr* 124(36): 1029-32, 1999.
- HALLIWEL, B & GUTTERIDGE, JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4a edition, Oxford University Press, 2007.
- HALVORSEN, S; THORSBY, PM & HAUG, E. Acute myocardial infarction in a young man who had been using androgenic anabolic steroids. *Tidsskr Nor Laegeforen* 124(2):170-2, 2004.
- HAMILTON, KL; POWERS, SK; SUGIURA, T; KIM, S et al.. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 281:H1346-52, 2001.
- HAMILTON, KL; STAIB, JL; PHILLIPS, T et al.. Exercise, antioxidants, and HSP72: Protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(7):800-809, 2003.
- HANSEN, CA & SIDELL, BD. Atlantic Hagfish cardiac muscle: Metabolic basis of tolerance to anoxia. *American Journal Physiology* 244:R356-62, 1983.
- HEUNKS, LMA; VINÃ, J; HERWAARDEN, CLAV et al. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Compative Physiology* 277:1697-1704, 1999.
- HINKEN, AC; KORTE, FS & MCDONALD, KS. Porcine cardiac myocyte power output is increased after chronic exercise training. *Journal of Applied Physiology* 101:40-6, 2006.

- HOEK, V; BECKER, LB, SHAO, Z et al. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circulation Research* 86:541-8, 2000.
- HOLLANDER, J; FIEBIG, R; GOROE, M et al. Superoxide gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pfluger Archives of European Journal of Physiology* 442: 426-34, 2001.
- HUGHES, TK; FULEP, E; T JUELICH, T; SMITH, EM AND STANTON, GJ. Modulation of Immune responses by anabolic androgenic steroids. *International Journal of Immunopharmacology* 17(11):857-63, 1995.
- HUSAIN, K & SOMANI, SM. Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. *Alcohol* 14:301-7, 1997.
- HWANG, H; REISER, PJ & BILLMAN, GE. Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion. *Journal of Applied Physiology* 99:230-6, 2005.
- ILIESCU, R; CUCCHIARELLI, VE; YANES, LL et al. Impact of androgen-induced oxidative stress on hypertension in male SHR. *American journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292:R731-5, 2007.
- ITO, WD; SCHAARSCHMIDT, S; KLASK, R et al. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29:2169-75, 1997.
- IWASAKI, Y; ASAI, M; YOSHIDA, M et al. Dehydroepiandrosterone-sulphate inhibits nuclear factor-k B dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:3449-45, 2004.
- JAIN, M; BRENNER, DA; CUI, L et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circulation Research* 93:e9–e16, 2003.
- JAIN, M; CUI, L; BRENNER, DA et al. Increased Myocardial Dysfunction After Ischemia-Reperfusion in Mice Lacking Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Circulation* 109:898-903, 2004.
- JEW, KN & MOORE, RL. Exercise training alters an anoxia-induced, glibenclamide-sensitive current in rat ventricular cardiocytes. *Journal of Applied Physiology* 92:1473-9, 2002.
- JI, LL; FU, RG; MITCHELL, EW et al. Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischemia and reperfusion in vivo. *Acta Physiologica Scandinavica* 151: 279-90, 1994.

- JI, LL. Exercise induced modulation of antioxidant defense. *Annals New York Academy of Sciences* 959:82-92, 2002.
- JI, LL; GOMEZ-CABRERA, MC; STEINHAFEL, N; VIANA, J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB Journal* 18:1499-506, 2004.
- JIN, H; YANG, R; LI, W et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 279:H2994-H3002, 2000.
- JONES, AW; RUBIN, LJ & MAGLIOLA, L. Endothelin-1 sensitivity of porcine coronary arteries is reduced by exercise training and is gender dependent. *Journal of Applied Physiology* 87: 1172-77, 1999.
- JULICHER, RH; TIJBURG, LB; STERREBERG, L et al. Decreased defence against free radicals in rat heart during normal reperfusion after hypoxic, ischemic and calcium-free perfusion. *Life Sciences* 35(12):1281-8, 1984.
- KARHUNEN, K; RAMÖ & KETTUNEN, R. Anabolic steroids alter the haemodynamic effects of endurance and deconditioning of rats. *Acta Physiological Scandinavica* 133:297-306, 1988.
- KATAKEYAMA, H; NISHIZAWA, M; NAKAGAWA, A et al. Testosterone inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells. *FEBS Letters* 530:129-32, 2002.
- KINDERMANN, W. Cardiovascular side effects of anabolic-androgenic steroids. *Herz* 31(6): 566-73, 2006.
- KNULL, HR; TAYLOR, WF & WELLS, WW. Effects of Energy Metabolism on *in Vivo* Distribution of Hexokinase in Brain. *The Journal of Biological Chemistry* 248:5414-7, 1973.
- KORZICK, DH. "Exercise-induced cardioprotections: Unique insights from cardiac, smooth and skeletal Muscle." *Acta Physiologica Scandinavica* 178:95, 2003.
- KOSENKO, EA; KAMINSKY, YG; STAVROVSKAYA, IG et al. The stimulatory effect of negative air ions and hydrogen peroxide on the activity of superoxide dismutase. *FEBS Letters* 410:309-312, 1997.
- KOWALTOWSKI, AJ; CASTILHO, RF & VERCESI, AE. Mitochondrial Permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495:12-5, 2001.
- KOWALTOWSKI, AJ; SEETHARAMAN, S; PAUCEK, P & GARLID, KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of the heart mitochondria. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 280:H649-57, 2001.

- KRAMER, HF & GOODYEAR<sup>1</sup>, LJ. Exercise, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 103: 388–395, 2007.
- LAAKSONEN, DE; ATALAY, M; NISKANEN, L et al. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Report* 4:53-9, 1999.
- LAMB, DR. Anabolic steroid and athletic performance, in: *Hormones and Sport Serono Symposia*, Raven Press, New York, vol 55: 257-73, 1989.
- LAGUENS, RP & GÓMEZ-DUMM, CL. Fine Structure of Myocardial Mitochondria in Rats after Exercise for One-Half to Two Hours. *Circulation Research* 21:271-80, 1967.
- LATCHMAN, DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovascular Research* 51:637-46, 2001.
- LAURENTI, R. Epidemiologia das doenças cardiovasculares no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 38(4):243-8, 1982.
- LAURENTI, R.; BUCHALLA, CM. & CARATIN, CVS. Isquemic heart disease. Hospitalization, length of stay and expenses in Brazil from 1993 to 1997. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 74(6): 488-92, 2000.
- LEE, IM; HSIEH, C; PAFFENBARGER, R. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *JAMA* 273:1179-84, 1995.
- LEE, L; HOROWITZ, J & FRENNEAUX, M. Metabolic manipulation in ischemic heart a novel approach to treatment. *European Heart Journal* 25:634-41, 2004.
- LEEUWENBURGH, C; HOLLANDER, J; LEICHTWEIS, S et al. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 272: R363-R369, 1997.
- LEICHTWEIS, SB; LEEUWENBURGH, C; PARMELEE, DJ et al. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiologica Scandinavica* 160(2):139-48, 1997.
- LENNON, SL; QUINDRY, JC; HAMILTON, KL et al. Elevated MnSOD is not required for exercise-required cardioprotection against myocardial stunning. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 287:975-80, 2004.
- LI, C & JACKSON, RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282:C227-41, 2002.

- LIBONATI, JR; GAUGHAN, JP; HEFNER, CA et al. Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training. *Medicine and Science in Sports Exercise* 29(4): 509-16, 1997.
- LINDFORD, NJ; SCHRINER, SE; RABINOVITCH, PS. Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria. *Cancer Research* 66(5):2497-9, 2006.
- LOCKE, FS & ROSENHEIM, O. Contribution to the physiology of isolated heart: the consumption of dextrose of mammalian cardiac muscle. *Journal of Physiology* 36:205-20, 1907.
- MACDOUGALL, JD; HICKS, AL; MacDONALD, JR et al. Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. *Journal of Applied Physiology* 84(6):2138-42, 1998.
- MACHLIN, LJ & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1:441-5, 1987.
- MAEKAWA, N; WADA, H; KANDA, T et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of American College of Cardiology* 39:1229-35, 2002.
- MARCIL, M; BOURDUAS, K; ASCAH, A & BURELLE, Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 290:H1549-57, 2006.
- MARINE, M; LAPALOMBELLA, J; MARGONATO, V et al. Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile. *European Journal of Applied Physiology* 99(5):503-10, 2007.
- McELROY, CL; GISSEN, SA & FISHBEIN, MC. Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 57:958-62, 1978.
- McMURRAY, RG; Ben-Ezra, V; Forsythe, WA & Smith, AT. Responses of endurance trained subjects to caloric deficits induced by diet or exercise. *Medicine and Science in Sports Exercise* 17(5):574-9, 1985.
- MEERSON, FZ; KAGAN, VE; KOZLOV YUP et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Research Cardiology* 77(5):465-85, 1982.
- MELCHERT, RB & WELDER, AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Medicine and Sciences in Sports Exercise*, September 1, 27(9):1252-62, 1995.
- MEYER, LE; MACHADO, LB; SANTIAGO, APSA et al. Mitochondrial Creatine Kinase Activity Prevents Reactive Oxygen Species Generation – Antioxidant

- role of mitochondrial kinase-dependent ADP Re-cycling activity. *Journal of Biological Chemistry* 281(49):37361-71, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2006: Uma análise da desigualdade em saúde. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude\\_brasil\\_2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_2006.pdf)
  - MINTO, CF; HOWE, C; WISHART, S et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nandrolone Esters in Oil Vehicle: Effects of Ester, Injection Site and Injection Volume. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281: 93–102, 1997.
  - MRFIT Research Group. Multiple risk factor intervention trial: risk factor changes and mortality results. *JAMA* 248(12):1465-77, 1982.
  - MUNIZ, J; DEL RIO, J; HUERTA, M & MARIN, JL. Effects os sprint and endurance training on passive stress-strain relation of fast and slow-twitch skeletal muscle in wistar rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 173:207-12, 2001.
  - NAPOLI, C.; PINTO, A. & CIRINO, G. Pharmacological modulation, preclinical studies, and new clinical features of myocardial ischemic preconditioning. *Pharmacology & Therapeutics* 88:311-31, 2000.
  - NATARJAN, R; SALLOUM, FN; FISHER, BJ et al. Hipóxia inducible factor-1 activation by prolyl-4 hidroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation Research* 98:133-40, 2006.
  - NAVARRO, A; GÓMEZ, C; LÓPEZ-CEPERO, JM & BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: surfival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electrons transfer. *American Journal Physiology: Regulatory Integrative Comparative Physiology* 286:R505-11, 2004.
  - NOTTIN, S; NGUYEN, LD; TERBAH, M & OBERT, P. Cardiovascular Effects of Androgenic Anabolic Steroids in Male Bodybuilders Determined by Tissue Doppler Imaging. *The American Journal of Cardiology* 97(6):912-915, 2006.
  - NOVOSEL, D.; NOLL, G. & LÜSCHER, TF. Corrected Formula for the calculation of electrical heart axis. *Croatian Medical Journal on line* 40(1):1-3, 1999.
  - NORATA, GD; TIBOLLA, G; SECCOMANDI, PM et al. Dihydrotestosterone Decreases Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Human Endothelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(2):546–554, 2006.
  - OHKUWA, T; SATO, Y & MAOI, NM. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 159:237-44, 1997.

- OSCAI, LB. The role of exercise in weight control. *Exercise and Sport Science Review* 1:103-123, 1973.
- PAAVONEN, T. Hormonal regulation of immune responses. *Annals of Medicine* 26:255-58, 1994.
- PACHER, P; NIVOROZHKIN, A & SZABÓ, C. Therapeutics effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews* 58:87-114, 2006.
- PANSARASA, O; D'ANTONA, G;GUALEA, RM et al. "Oxidative stress": effects of mild endurance training and testosterone treatment on at gastrocneius musle. *European Journal of Applied Physiology* 87:550-5, 2002.
- PARADATHATHU, T; GROOT, H & KEHRER, JP. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radicals Biology and Medicine* 13(4):289-97, 1992.
- PAROO, Z., HAIST, JV., KARMAZYN, M. & NOBLE, EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females. Consequences of a novel Sex-specific heat shock protein 70 response. *Circulation Research* 90:911-17, 2002.
- PASTORINO, JG & HOEK, JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Current Medicinal Chemistry* 10(16):1535-51, 2003.
- PAVLOU, KN; STEFFEE, WP; LERMAN, RH & BURROWS, BA. Effects of dieting and exercise on lean body mass, oxygen uptake, and strength. *Medicine and Science in Sports Exercise* 17(4): 446-71, 1985.
- PEDERSEN, BK & HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and Imune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiological Reviews*, 80(3):1055-81, 2000.
- PEDERSEN, BK; STEENSBERG, A &SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin 6: Possible biological effects. *The Journal of Physiology* 536(2):329-37, 2001.
- PELLICCIA, A; CULASSO, F; Di PAOLO, FM & MARON, BJ. Physiologic Left Ventricular Cavity dilatation in elite athletes. *Annual International of Medicine* 130:23-31, 1999.
- PEREIRA,B. Exercício como pró-oxidante. *Revista Paulista de Educação Física* 8(2):77-89, 1994.
- PEREIRA-JR, PP; CHAVES, EA; COSTA-E-SOUSA, RH et al. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *European Journal of Applied Physiology* 96:487-94, 2006.

- PEY, A; SABORIDO, A; BLÁZQUEZ, I et al. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 87:269-77, 2003.
- PHILLIS, BD; IRVINE, RJ & KENNEDY, JA. Combined cardiac effects of cocaine and the anabolic steroid, nandrolone, in the rat. *European Journal of Pharmacology* 398:263-272, 2000.
- POWERS, SK; CRISWELL, D; LAWLER, D et al. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *American Journal of Physiology* 265:H2094-8, 1993.
- POWERS, SK; DEMIREL, HA; VINCENT, HK et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 275(44):R1468-77, 1998.
- POWERS, SK; LOCKE, M & DEMIREL, HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Medicine and Science in Sports Exercise* 33(3):386-92, 2001.
- POWERS, S. Exercício, Antioxidantes e “Cardioproteção”. *Sports Science Exchange* 36 (jan, fev, mar - em: [www.gssi.com.br](http://www.gssi.com.br)), 2003.
- RAKHIIT, RD; EDWARDS, RJ & MARBER, MS. Nitric Oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. *Cardiovascular Research* 43:621-7, 1999.
- RAMIRES, PR & JI, LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 281:H679-88, 2001.
- RAMO, P; KETTUNEN, R; TIMISJARVI, J et al. Anabolic steroids alter the haemodynamic effects of endurance training on the canine left ventricle. *Pflugers Archives* 410(3): 272-8, 1987.
- RAO, PS; COHEN, MV; AND MUELLER, HS. Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 15(10):713-6, 1983.
- ROZANSKI, A; BLUMENTHAL, JA & KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 101:E177-8, 1999.
- SALO, DC; DONOVAN, CM & DAVIES, KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radicals and Biology Medicine* 11(3):239-46, 1991.
- SCHMIDT, BMW; GERDES, D; FEURING, M et al.. Rapid, Nongenomic Steroid Actions: A new age? *Frontiers in Neuroendocrinology* 21:57–94, 2000.

- SEDLACK, J & LINDSAY, RH. Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25:192-205, 1968.
- SEMENZA, GL. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 88:1474-80, 2000a.
- SEMENZA, GL. Surviving Ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia inducible-factor 1. *The Journal of Clinical Investigation* 106(7):809-12, 2000b.
- SEN, CK; ATALAY, M & HANNINEN, O. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *Journal of Applied Physiology* 77:2177-87, 1994.
- SEN, CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied Physiology* 79(3):675-86, 1995.
- SHAHIDI, NT. A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. *Clinical Therapeutics* 23(9):1355-90, 2001.
- SHLAFER, M; MYERS, CL & ADKINS, S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *Journal of Molecular Cell Cardiology* 19:1195-206, 1987.
- SILVA, MM; SARTORI, A; BELISLE, E & KOWALTOWSKI, AJ. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, and enhances K<sup>+</sup> transport. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 285:H154-62, 2003.
- SINGH, A; LEE, KJ; LEE, CY et al. Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 80: 1795-1804, 1989.
- SOMANI, SM; FRANK, S & RYBACK, LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat subcellular fractions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 51:627-34, 1995.
- SOUTHWORTH, R; DAVEY, KAB; WARLEY, A & GARLICK, PB. A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292:H378-86, 2007.
- STANLEY, WC; LOPASCHUK, GD; HALL, JL & McCORMACK, JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. *Cardiovascular Research* 33:243-57, 1997.
- STARNES, JW; TAYLOR, RP & CICCOLO, JT. Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats.

European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation 12:169-74, 2005.

- STARNES, JW; BARNES, BD & OLSEN, ME. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction. *Journal of Applied Physiology* 102: 1793-1798, 2007.
- STEENBERGEN, C; MURPHY, E; WATTS, JA & LONDON, RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circulation Research* 66:135-146, 1990.
- STEHNO-BITTEL, L; LAUGHLIN, MH & STUREK, M. Exercise training alters Ca release from coronary smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 259: H643-7, 1990.
- STEHNO-BITTEL, L; LAUGHLIN, MH & STUREK, M. Exercise training depletes sarcoplasmic reticulum calcium in coronary smooth muscle. *Journal of Applied Physiology* 71: 1764-73, 1991.
- STOFER, AR. The early diagnosis of experimental heart infarct in rats with the TTC reaction. *Pathology and Microbiology (Basel)* 27:467-74, 1964
- STOLT, A; KARILA, T; VIITASALO, M et al. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *The American Journal of Cardiology* 84(1):364-66, 1999.
- SULLIVAN, ML; MARTINEZ, CM; GENNIS, P & GALLAGHER, EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Cardiovascular Diseases* 41(1):1-15, 1998.
- SYMONS, JD; RENDIG, SV; STEBBINS, CL & LONGHURST, JC. Microvascular and myocardial contractile responses to ischemia: influence of exercise training. *Journal of Applied Physiology* 88:433-42, 2000.
- SZENCZI, O; KEMECSEI, P; MIKLÓS, Z et al. In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 449(6):518-25, 2005.
- TAKAHASHI, M; TATSUGI, Y & KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroids in male rats. *Endocrinology Journal* 51:425-34, 2004.
- TAMAKI, T; UCHIYAMA, S; UCHIYAMA, Y et al.. Anabolic Steroids increase exercise tolerance. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism* 280: E973-81, 2001.
- TAULER, P; GIMENO, I; AGUILÓ, A et al. Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflügers Archives – European Journal of Physiology* 438:782–787, 1999.

- TAVARES, KCS. Efeito Cardioprotetor do Efluente de Coração de rato submetido ao pré-condicionamento isquêmico. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- TAVAZZI, B; LAZZARINO, G; DI PIERRO, D & GIARDINA, B. Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free Radicals in Biology and Medicine* 13(1):75-8, 1992.
- TAYLOR, RP; HARRIS, MB & STARNES, JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Heart Circulatory Physiology* 45:H1098-102, 1999.
- TERADA, LS; RUBINSTEIN, JD; LESNEFSKY, EJ et al. Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury os ischemic rabbit myocardium. *American journal Physiology* 29:H805-10, 1991.
- THOMPSON, PD; SADANIANTZ, A; CULLINANE, EM ET AL.. Left ventricular function is not impaired in weight-lifters who use anabolic steroids. *Journal of American College of Cardiology* 19(2): 278-82, 1992.
- THORP, DB; HAST, JV; LEPPARD, J et al. Exercise training improves myocardial tolerance to \*ischemia\* in male but not female rats. *American Journal Physiology – Integrative and Comparative Physiology*, may, 2007.
- TINGUS, SJ & CARLSEN, RC. Effect of continuous infusion of an anabolic steroid on murine skeletal muscle. *Medicine and Sciences in Sports Exercise* 25(4): 485-94, 1993.
- TOMAI, F; PERINO, M; GHINI, AS et al. Exercise-Induced myocardial ischemia triggers the early phase of preconditioning but not the late phase. *American Journal of Cardiology* 83(4): 586-8, 1999.
- TRIFUNOVIC, B; NORTON, GR; DUFFIELD, MJ et al.. An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 268:H1096-103, 1995.
- UETA, H; OGURA, R; SUGIYAMA, M et al.O<sub>2</sub>· spin trapping on cardiac submitochondrial particles isolated from ischemic and non-ischemic myocardium. *Journal of Molecular Cell Cardiology* 22(8):893-9, 1990.
- UNDERWOOD, FB; LAUGHLIN, MH & STUREK, M. Altered control of calcium in coronary smooth muscle muscle cells by exercise training. *Medicine and Sciences in Sports Exercise* 26: 1230-8, 1994.
- VAN ETEN, LM; VERSTAPPEN, FT & WESTERTERP, KR. Effects of body build on weight-training induced adaptations in body composition and muscular strength. *Medicine and Science in Sports Exercise* 26(4):515-21, 1994.

- WANG, W & BELLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacology Reviews* 50:335-56, 1998.
- WALSH, GM & FERRONE, RA. Ether-induced vasodilation in the rat. *Research Communications and Chemistry Pathology and Pharmacology* 24(1): 67-76, 1979.
- WEINECK, J. *Biologia do Esporte*. Editora Manole – SP, pág 73-109, 1991.
- WEISS, JN; KORGE, P; HONDA, HM & PING, P. Role of the mitochondrial Permeability transition in myocardial disease. *Circulation Research* 93:292-301, 2003.
- WELIN, C; ROSENGREN, WEDEL, H & WILHELMSEN. Myocardial Infarction in relation to work, family, and life events. *Cardiovascular Risk Factors* 5:30-8, 1995.
- WENGER, RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub> sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB Journal* 16:1151-62, 2002.
- WERNIS SW, FANTONE JC, VENTURA A, et al. Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated blood-perfused hearts after global ischaemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24:1215–1220, 1992.
- WHO European Collaborative Group. European collaborative trial of multifactorial prevention of coronary heart disease: final report on the 6-year results. *LANCET* 848(6):869-75, 1986.
- WILSON, JE. Rapid purification of mitochondrial hexokinase from rat brain by a single affinity chromatography step on Affi-gel blue. *Prep Biochemistry* 19:13-21, 1989.
- WOLIN, MS; DAVIDSON, CA; KAMINSKI, PM et al. Oxidant-nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue. *Biochemistry (Mosc)* 63(7):810-6, 1998.
- WOLIN, MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis, Trombosis, and Vascular Biology* 20:1430-42, 2000.
- WOODWISS, AJ; TRIUNOVIC, B; PHILIPPIDES, M & NORTON, R. Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. *Journal of Applied Physiology* 88:409-15, 2000.
- WU, FCW. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clinical Chemistry* 43(7):1289-92, 1997.
- XI, L; TAHER, M; YIN, C. et al. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1 $\alpha$  and AP-1 and

iNOS signaling. *American Journal Physiology: Heart and circulatory Physiology* 287:H2369-75, 2004.

- YAMASHITA, N; HOSHIDA, S; OTSU, K et al. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *The Journal of Experimental Medicine* 189(11):1699-706, 1999.
- YAMASHITA, N; BAXTER, GF & YELLON, DM. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart* 85:331-6, 2001.
- ZAUGG, M; LUCCHINETTI, E; VECKER, M et al. Anaesthetics and Cardiac Preconditioning. Part I. Signaling and Cytoprotective Mechanisms. *British Journal of Anaesthesia* 91(4):551-65, 2003.
- ZEWE, V & FROMM, HJ. Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 237:1668-75, 1962.
- ZHANG, LQ; ZHANG, XQ; MUSCH, TI et al.. Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes. *Journal of Applied Physiology* 89:1099-105, 2000.
- ZHANG, KR; LIU, HT; ZHANG, HF et al. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis* 12(9):1579-88, 2007.
- ZIMMER, HG; BUNGER, R; KOSCHINE, H et al. Rapid stimulation on the hexose monophosphate shunt in the isolated perfused rat heart: possible involvement of oxidized glutathione. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13:531-535, 1981.

**8. APÊNDICE 1**

Artigo publicado em revista internacional, utilizando os dados da primeira parte desta tese de doutorado

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)