

PEDRO PAULO PEREIRA JUNIOR

**CONTROLE DINÂMICO CARDIOVASCULAR
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ABUSO
DE ESTEROIDE ANABÓLICO**

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



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Rio de Janeiro, 2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Pereira Junior, Pedro Paulo
Controle Dinâmico Cardiovascular em um Modelo
Experimental de Abuso de Esteroide Anabólico / Pedro
Paulo Pereira Junior. Rio de Janeiro, 2009.
xv, 136 f.

Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Fisiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientador: José Hamilton Matheus Nascimento

1. Dinâmica Cardiovascular. 2. Esteroide Anabólico
3. Sistema Nervoso Autônomo – Teses.
I. Nascimento, José Hamilton Matheus (Orient.).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Dr. José Hamilton Matheus Nascimento, contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Pedro Paulo Pereira Junior

**CONTROLE DINÂMICO CARDIOVASCULAR
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ABUSO
DE ESTEROIDE ANABÓLICO**

Rio de Janeiro, 03 de Dezembro de 2009.

José Hamilton M. Nascimento, Doutor, IBCCF/UFRJ (Orientador)

Luis Aureliano Imbiriba Silva, Doutor, EEFD/UFRJ (Revisor)

Antonio Carlos Campos de Carvalho, Doutor, IBCCF/UFRJ

Emerson Lopes Olivares, Doutor, UFRRJ

Valdo José Dias da Silva, Doutor, UFTM

RESUMO

Nos dias de hoje, o abuso de esteroides anabólicos (EA) não mais representa uma questão exclusiva ao universo do esporte de alto rendimento, tendo, diferentemente disto, tornado-se um problema de saúde pública global, o qual é associado à ocorrência de distúrbios cardiovasculares e à morte súbita cardíaca. Sabe-se que a harmoniosa regulação cardiovascular por ambos os ramos do sistema nervoso autônomo é de fundamental importância para a manutenção da estabilidade elétrica do coração. A presente tese teve como principal objetivo investigar, em ratos, se o tratamento crônico com altas doses de esteroide anabólico (Decanoato de Nandrolona – DECA) poderia conduzir à disfunção dos mecanismos de controle dinâmico do sistema cardiovascular. Os resultados da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca apontaram, no grupo DECA, um quadro de disfunção autonômica, representado pelo desvio do balanço simpato-vagal, na direção da hiperatividade simpática, o que pode constituir, por si só, um importante mecanismo através do qual o abuso de EA seja associado ao aumento no risco cardiovascular, com maior suscetibilidade à ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca. Adicionalmente, a maior resposta cronotrópica à estimulação adrenérgica, encontrada nos corações isolados dos animais tratados com DECA, indica que o estabelecimento de um perfil de hiperresponsividade às catecolaminas, secundário ao tratamento crônico com EA, possa somar-se ao possível mecanismo central de aumento no tônus simpático. A maior resposta dipsogênica e de apetite por sódio no grupo DECA, exibida após desafio de privação hídrica por 24h, sugere um possível envolvimento adicional do sistema renina-angiotensina (SRA) central sobre os distúrbios da dinâmica cardiovascular encontrados neste grupo. A ausência de alterações na função cardíaca sistólica e diastólica no grupo DECA sugerem que a disfunção autonômica constitua uma manifestação precoce da fisiopatologia cardiovascular do abuso de EA, a qual, ao longo de seu curso temporal, e em possível associação com o crônico aumento na atividade do SRA central, possa contribuir substancialmente para o desenvolvimento de alterações na arquitetura miocárdica, as quais são tipicamente associadas à instabilidade elétrica cardíaca, arritmogênese e morte súbita.

ABSTRACT

Anabolic steroid (AS) abuse is widespread nowadays, both among athletes and non-athletes, and so it has become a public health issue, which associates to cardiovascular abnormalities and sudden cardiac death. It is known that the balanced sympathovagal interplay plays a pivotal role in the maintenance of cardiac electrical stability. The major aim of this thesis was to investigate, using the rat as an animal model, whether the chronic treatment with high doses of an anabolic steroid (Nandrolone Decanoate – DECA) would lead to dysfunctional cardiovascular dynamic control. Power spectral heart rate variability analysis revealed the presence of autonomic dysfunction in DECA-treated rats, as these animals showed a shift in sympathovagal balance towards sympathetic predominance, which may constitute an important mechanism linking AS abuse to ventricular arrhythmogenesis and sudden cardiac death. The exaggerated chronotropic response to adrenergic stimulation found in DECA-treated animals, as shown by the isolated heart experiments, indicates that catecholamine hyperresponsivity, secondary to high-dose AS chronic treatment, may constitute a peripheral component adding to the possible central mechanism that leads to enhanced sympathetic tone. The higher dipsogenic and sodium appetite responses to 24h water deprivation challenge, shown in the DECA group, suggest a possible additional involvement of the central renin-angiotensin system (RAS) on the cardiovascular dynamics abnormalities presented by these animals. The lack of alterations in systolic and diastolic cardiac function, in the DECA group, suggest that autonomic dysfunction may constitute an early manifestation in the cardiovascular pathophysiology of AS abuse, which, in association with the possible chronic central RAS overactivation, may substantially contribute to the development of the myocardial architecture abnormalities that are typically associated to cardiac arrhythmogenesis and sudden death.

Ao meu ídolo e querido avô, Sr. Francisco “Tatá” da Costa Pereira, dedico cada passo de minha vida. Não há de existir mais a dor, mas sim, a mais doce das lembranças, e o seu legado eterno: sorriso fácil e leveza no ser; honestidade, dedicação, e a bravura do mais gentil dos homens; amor pela família, amor pela vida. Sorte... sorte de quem conheceu o Sr.

Muito obrigado por todos esse anos.

Eu te amo.

Fica com Deus.

AGRADECIMENTOS

Com todo o amor, agradeço ao pai, Pedro Paulo, à mãe Terezinha, e ao irmão Daniel. Por vocês, e com vocês, a minha alma sorri. Serão suas as minhas vitórias, sempre.

A todos os integrantes da minha maravilhosa família, pelo apoio e presença em todos os momentos.

À Danielle, por todas as boas lembranças.

Ao professor José Hamilton, pela oportunidade e ensinamentos ao longo dos anos.

Aos professores Fátima Palha e Luis Aureliano, mestres e formadores exemplares em todos os aspectos.

Ao professor Antonio Carlos, pelo respeito, confiança e constante incentivo.

À professora Simone Garcia, por todo o apoio que jamais será esquecido.

Às professoras Regina Goldenberg e Cristiane Del Corso, pela constante disposição em ajudar praticada ao longo destes anos.

À Cássia, Patrícia, Ruy e Iracema, colaboradores muito mais do que fundamentais para que esta tese se tornasse possível.

Ao Professor Luis Carlos Reis, pela valiosa colaboração.

Aos velhos amigos, geração dois mil e poucos: Amarildo, Angélica, Bruno Esporcatte, Bruno Pettendorfer, Carol, Círia, Diogo, Elen, Emerson, Emiliano, Fabrício, Florian, Fred, Hilmar, João Pedro, Jorge, Luciane, Luíz Eduardo, Luiz Fernando, Moacir, Nathália, Ramon, Ricardo e todos mais.

À atual geração de amigos do LEFC e LCCM: Andréa, Cristiano, Daniel, Emanuelle, Jamil, Juliana, Léo, Mara, Maurício, Paulo, Sílvio e todos mais.

Ao grande Sr. Celso, pela amizade sincera e ajuda em diversos momentos.

À Professora Sônia Costa e demais membros da Comissão de Biossegurança do CCS.

À Sandra Brito, pelo sempre excelente trabalho.

Aos velhos amigos do rock insulano. Cabelos vão, mas que fique a rebeldia. Keep on rockin'!

A todos aqueles que chegarem até esta linha um dia qualquer.

A Deus, o invisível evidente.

Muito obrigado!

“Lose is more than hesitate” (QOTSA)

“And when the broken-hearted people
living in the world agree,
there will be an answer:
Let it be”
(Paul McCartney)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura molecular da testosterona e do decanoato de nandrolona. | 4 |
| Figura 2. Esquema ilustrativo da interação entre vias genômicas e não-genômicas para a ação de hormônios esteroides. | 6 |
| Figura 3. Diagrama esquemático do protocolo experimental. | 34 |
| Figura 4. Método não-invasivo para aquisição do ECG em ratos conscientes. | 37 |
| Figura 5. Metodologia minimamente invasiva atualmente aplicada para registro do ECG em ratos conscientes. | 40 |
| Figura 6. Trecho do sinal de ECG original, contendo flutuações na linha de base; Linha de base do trecho, obtida pela aplicação de filtro passa-baixa (7 Hz) no sinal original; Sinal resultante da aplicação do filtro por subtração de linha de base para o trecho em questão. | 45 |
| Figura 7. Plotagem de Bland-Altman comparando os valores de RR obtidos, para o segmento, após aplicação de cada uma das abordagens de filtragem do ECG. | 47 |
| Figura 8. Diagrama esquemático ilustrando a metodologia empregada na extração da sensibilidade do barorreflexo espontâneo por análise espectral. | 53 |
| Figura 9. Gráficos de VFC extraídos de um animal representativo. | 58 |
| Figura 10. Resultados após bloqueios autonômicos. | 60 |
| Figura 11. Evolução do peso corporal ao longo das 11 semanas de tratamento. | 61 |
| Figura 12. Traçados de ECG e tacogramas, obtidos na Semana 8 do protocolo experimental, referentes a um animal CONTROLE e a um animal DECA. | 63 |
| Figura 13. Evolução dos índices de VFC no domínio do tempo obtidos ao longo de 8 semanas. | 65 |
| Figura 14. Evolução dos perfis espectrais da frequência cardíaca. | 67 |
| Figura 15. Evolução dos índices de VFC no domínio da frequência obtidos ao longo de 8 semanas. | 68 |
| Figura 16. Análise de flutuação sem tendência (DFA) conduzida em 7000 intervalos RR, adquiridos na semana 8 do protocolo experimental, em um animal CONTROLE e um animal DECA. | 69 |
| Figura 17. Evolução dos índices não-lineares de VFC no obtidos ao longo de 8 semanas. | 71 |
| Figura 18. Plotagens de sequências crescentes (+IP/+PAS, acima) e decrescentes (-IP/-PAS, abaixo) para um animal CONTROLE e um animal DECA representativos. | 73 |
| Figura 19. Comparação da sensibilidade barorreflexa (SBR) entre os grupos, obtida pelo método de sequências, ao final do protocolo experimental. | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Séries de intervalos de pulso e de pressão arterial sistólica batimento a batimento, espectros de IP e PAS, e coerência entre os sinais de IP e PAS, em um animal CONTROLE e um animal DECA. | 75 |
| Figura 21. Comparação da sensibilidade barorreflexa entre os grupos, calculada pelo método da análise espectral (índice alfa), ao final do protocolo experimental. | 76 |
| Figura 22. Comparação entre os grupos para os níveis basais de ingestão de água e solução de NaCl a 1,8%, na semana 9 do protocolo experimental. | 78 |
| Figura 23. Comparações seriadas entre os grupos para os níveis de ingestão de água e salina após 24 h de privação hídrica. | 79 |
| | |
| Tabela 1. Esteroides anabólicos utilizados abusivamente por praticantes de musculação em academias de São Paulo, capital. | 17 |
| Tabela 2. Valores individuais de VFC. | 59 |
| Tabela 3. Efeitos do tratamento com DECA sobre o peso corporal e cardíaco dos ratos. | 62 |
| Tabela 4. Efeitos do tratamento com DECA sobre a função cardíaca <i>ex vivo</i> . | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Alta frequência

ANG II – Angiotensina II

ApEn – Entropia Aproximada

BF – Baixa frequência

DFA – Análise de flutuação destendenciada

DECA - Decanoato de nandrolona

EA – Esteroide(s) anabólico(s)

ECG - Eletrocardiograma

FC – Frequência Cardíaca

ISO – Isoproterenol

LVDP – Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

LVEDP – Pressão do ventrículo esquerdo ao fim da diástole

LVSP – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

MSC – Morte súbita cardíaca

PAS – Pressão arterial sistólica

pNN5 – Percentual de intervalos sucessivos com diferença superior a 5 ms

RMSSD – Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR sucessivos

RR – Intervalo médio entre as ondas R do eletrocardiograma

SBR – Sensibilidade barorreflexa

SDNN – Desvio padrão dos intervalos RR

SNA – Sistema nervoso autônomo

SRA – Sistema renina-angiotensina

VFC – Variabilidade da frequência cardíaca

VPA – Variabilidade da pressão arterial

+dP/dt – Pico da primeira derivada positiva de pressão no ventrículo esquerdo

-dP/dt – Pico da primeira derivada negativa de pressão no ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Testosterona | 1 |
| 1.1.1 Definições Básicas | 1 |
| 1.1.2 Aspectos Históricos | 1 |
| 1.2 Esteroides Anabólicos | 2 |
| 1.2.1 Definições Básicas | 2 |
| 1.2.2 Decanoato de Nandrolona | 2 |
| 1.3 Mecanismos de Ação de Hormônios Esteroides | 5 |
| 1.4 Aplicação Clínica x Abuso de Esteroides Anabólicos | 6 |
| 1.5 Abuso de Substâncias e a Busca pelo Desempenho | 8 |
| 1.5.1 Aspectos Históricos – Antiguidade e Idade Média | 8 |
| 1.5.2 Esporte de alto rendimento e abuso na Era Moderna e Contemporânea | 9 |
| 1.6 Epidemiologia e Padrões de Abuso de Esteroides Anabólicos | 11 |
| 1.6.1 Prevalência Global | 11 |
| 1.6.2 Prevalência no Brasil | 14 |
| 1.6.3 Padrões de Abuso | 16 |
| 1.7 Efeitos Colaterais Secundários ao Abuso de EA | 17 |
| 1.7.1 Síndromes e Sintomas Psiquiátricos | 19 |
| 1.8 Esteroides Anabólicos: Abuso e Complicações Cardiovasculares | 21 |
| 1.9 Morte Súbita Cardíaca | 22 |
| 1.10 Esteroides Anabólicos e Morte Súbita Cardíaca | 23 |
| 1.10.1 Complicações Vasculares | 23 |
| 1.10.2 Hipertrofia Cardíaca, Alterações Estruturais e Funcionais | 24 |
| 1.11 Justificativa e Hipótese | 26 |
| 2 OBJETIVOS | 32 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 Animais Experimentais | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.1 | Protocolos de Tratamento | 33 |
| 3.1.2 | Medidas Biométricas | 34 |
| 3.2 | Eletrocardiografia no Estado Não-anestesiado | 35 |
| 3.2.1 | Método não-invasivo (descrição e validação) | 35 |
| 3.2.2 | Metodologia Atual | 39 |
| 3.3 | Aquisição do ECG | 40 |
| 3.4 | Aquisição da Pressão Arterial Contínua | 41 |
| 3.5 | Dinâmica Cardiovascular | 42 |
| 3.5.1 | Implementação de Filtro por Subtração de Linha de Base do ECG | 42 |
| 3.5.2 | Variabilidade da Frequência Cardíaca – Métodos Lineares | 47 |
| 3.5.3 | Variabilidade da Frequência Cardíaca – Métodos Não-lineares | 48 |
| 3.5.4 | Variabilidade da Pressão Arterial | 49 |
| 3.5.5 | Sensibilidade Barorreflexa | 50 |
| 3.6 | Avaliação da Função Cardíaca <i>ex vivo</i> | 53 |
| 3.7 | Estudo do Comportamento Ingestivo | 55 |
| 3.7.1 | Ingestão de Água e Sal | 55 |
| 3.7.2 | Ingestão de Ração | 55 |
| 3.8 | Análise Estatística | 56 |
| | | |
| 4 | RESULTADOS | 57 |
| | | |
| 4.1 | Validação do ECG Não-invasivo em Ratos Não-anestesiados | 57 |
| 4.2 | Efeitos do Tratamento com DECA sobre o Peso Corporal e Cardíaco | 61 |
| 4.3 | Dinâmica Cardiovascular | 62 |
| 4.3.1 | Variabilidade da Frequência Cardíaca - Métodos Lineares | 64 |
| 4.3.2 | Variabilidade da Frequência Cardíaca - Métodos não-lineares | 69 |
| 4.3.3 | Variabilidade da Pressão Arterial (VPA) | 72 |
| 4.3.4 | Sensibilidade Barorreflexa | 72 |
| 4.4 | Função Cardíaca <i>ex vivo</i> | 76 |
| 4.5 | Comportamento Ingestivo | 78 |
| 4.5.1 | Ingestão de Água e Sal | 78 |
| 4.5.2 | Ingestão de Ração | 79 |

| | |
|-----------------------------------|------------|
| 5 DISCUSSÃO | 80 |
| 6 CONCLUSÕES | 92 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |
| APÊNDICE A | 108 |
| APÊNDICE B | 111 |
| APÊNDICE C | 129 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Testosterona

1.1.1 Definições Básicas

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino, ou andrógeno, sendo produzida, em homens, essencialmente nos testículos. Todos os andrógenos se classificam como hormônios esteroides, tendo como molécula precursora o colesterol. A testosterona tem como principal metabólito ativo a 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), a qual é obtida através de sua redução. O processo de transformação da testosterona em 5 α -DHT é catalisado pela enzima 5 α -redutase, e sabe-se que 5 α -DHT é capaz de apresentar níveis de biopotência significativamente superiores aos da testosterona em alguns tecidos (BARDIN & PAULSEN, 1981).

1.1.2 Aspectos Históricos

A função endócrina dos testículos foi inicialmente sugerida na antiguidade. É descrito que o lendário cirurgião indiano Susruta, em torno do ano 140 aC, proporia a ingestão de tecido testicular como estratégia para cura de impotência sexual (KOCHAKIAN & YESALIS, 1993).

No ano de 1889, o respeitado médico francês Brown-Séquard, em seu mais famoso experimento, realizou nele próprio uma injeção de extrato aquoso de testículos de cães e cobaias, descrevendo o resultado como uma melhora em sua “saúde geral” e aumento na força muscular (FREEMAN *et al.*, 2001). Na sequência dos acontecimentos, nas décadas de 1920 e 1930, diversos experimentos foram realizados utilizando-se injeções de extrato testicular em animais castrados, mostrando-se que tal abordagem seria capaz de levar à reversão dos efeitos da

castração, tanto no âmbito das características sexuais secundárias, quanto da promoção do anabolismo (KOCHAKIAN & YESALIS, 1993; SCHÄNZER, 1996).

No ano de 1935 a testosterona foi primeiramente isolada, identificada, e sintetizada em laboratório a partir do colesterol. David e colegas atribuíram o nome ao hormônio, o qual, ao fim daquele ano, teve sua síntese descrita por dois grupos distintos simultaneamente, os quais eram respectivamente liderados por Buternandt e Ruzicka. Tal feito rendeu a ambos os pesquisadores a indicação ao Prêmio Nobel de química em 1939, indicação esta da qual Butenandt se viu obrigado a declinar, em função das imposições do regime nazista (FREEMAN *et al.*, 2001).

1.2 Esteroides Anabólicos

1.2.1 Definições Básicas

Como esteroides androgênico-anabólicos, ou, simplesmente, esteroides anabólicos (EA), definem-se os hormônios sintéticos análogos à testosterona, os quais são obtidos a partir de modificações em sua estrutura molecular, visando à potencialização de seus efeitos anabólicos aliada à redução dos androgênicos. Em geral, é descrito que os EA são capazes de apresentar maior resistência à metabolização, em comparação à testosterona (STRAUSS & YESALIS, 1991; SCHÄNZER, 1996).

1.2.2 Decanoato de Nandrolona

A nandrolona (19-nortestosterona; IUPAC: 17 β -Hydroxi-4-estren-3-ona) é um dos mais populares esteroides anabólicos. A nandrolona é, classicamente, classificada como sendo uma substância xenobiótica, no entanto, paradoxalmente,

relatos recentes aventam a possibilidade de que baixíssimos níveis deste esteroide possam ser produzidos de maneira endógena, como intermediários na síntese de estrógenos a partir de precursores androgênicos (BRICOUT & WRIGHT, 2004). A síntese laboratorial da nandrolona foi inicialmente descrita no ano de 1950 por Birch, tendo sido confirmada em 1953 por Wilds e Nelson (BRICOUT & WRIGHT, 2004).

A partir da testosterona, a nandrolona é obtida através da deleção do radical metil na posição 19. Tal modificação é capaz de fazer com que a nandrolona apresente maior resistência à metabolização e à aromatização, e maior afinidade pelo receptor androgênico (KUHN, 2002). No entanto, contrariamente ao que ocorre com a testosterona, a 5 α -redução da nandrolona reduz a afinidade da molécula pelo receptor androgênico (BERGINK *et al.*, 1985). Tal fato explica o potente efeito da nandrolona em tecidos desprovidos de atividade da 5 α -redutase, como é o caso do tecido muscular, e o reduzido efeito nos tecidos com alta atividade da 5 α -redutase, como na próstata. A nandrolona é metabolizada no fígado, sendo os seus principais metabólitos a 19-norandrosterona (19-NA), 19-noreticolanolona (19-NE) e 19-norepiandrosterona (19-NEA). Em exames de controle anti-doping, o uso de nandrolona por atletas é detectado a partir da presença dos metabólitos 19-NA e 19-NE na urina, utilizando-se metodologias de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (BRICOUT & WRIGHT, 2004).

No passado, foi estabelecido o conceito de índice anabólico, objetivando a determinação de um padrão capaz de descrever a razão entre os efeitos anabólicos e androgênicos de diversos EA em comparação à testosterona, para a qual se estabeleceu o valor de 1 (WALLACE, 2001; KUHN, 2002). A nandrolona apresenta

uma das maiores razões anabólico-androgênicas entre os EA, tendo valor 10 (KUHN, 2002).

A nandrolona é comercializada, principalmente, sob a forma de seu éster decanoato (decanoato de nandrolona, Deca Durabolin[®]; fórmula empírica: $C_{28}H_{44}O_3$; peso molecular: 428,65), sendo, raramente, também comercializada em seu éster fenilpropionato (fenilpropionato de nandrolona, Durabolin[®]; fórmula empírica: $C_{27}H_{34}O_3$; peso molecular: 406,6). A figura 1 ilustra a estrutura molecular da testosterona e do decanoato de nandrolona.

O Decanoato de Nandrolona (DECA) é comercializado em diluição em veículo oleoso, sendo que, para o DECA produzido no Brasil, a composição precisa do veículo é de 90% de óleo de amendoim / 10% de álcool benzílico (v/v). A principal via de administração da nandrolona é a intramuscular, o que, em combinação com as propriedades do veículo da droga, permite a lenta liberação da nandrolona na circulação. Em um recente estudo farmacocinético conduzido em humanos, demonstrou-se que, após uma única injeção intramuscular de DECA, o pico de sua concentração sérica é atingido em 30-72 h, sendo a meia vida de 7-12 dias (BAGCHUS *et al.*, 2005).

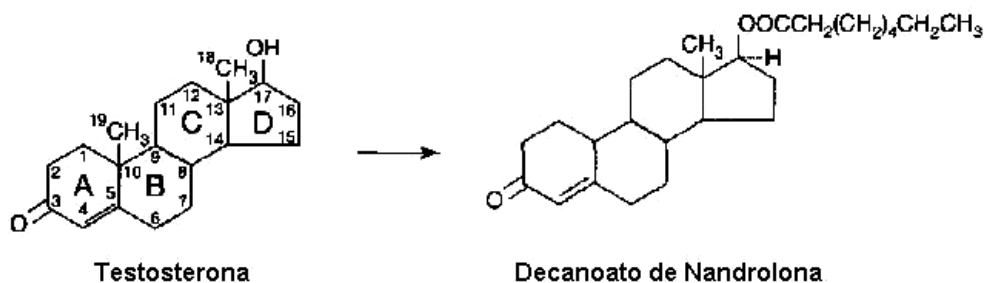


Figura 1. Estrutura molecular da testosterona e do decanoato de nandrolona. Modificado de SHAHIDI, 2001.

1.3 Mecanismos de Ação de Hormônios Esteroides

O mecanismo clássico descrito para a ação de hormônios esteroides é de natureza genômica. Neste tipo de efeito, caracterizado pela resposta lenta (tempo maior que 10 minutos), é necessário que haja interação do ligante com receptor intracelular, o que leva à formação de complexo capaz de se ligar a elementos responsivos específicos no DNA, desencadeando a transcrição gênica e, conseqüentemente, a síntese de proteínas (CHRIST & WEHLING, 1998). Sob o ponto de vista clínico, ou seja, no organismo do indivíduo como um todo, os efeitos genômicos surgem horas ou dias após a interação dos hormônios esteroides com seus receptores (LÖSEL *et al.*, 2003).

No entanto, ultimamente tem sido dada grande importância ao estudo dos efeitos de resposta rápida (tempo menor que 10 minutos), também descritos como efeitos não-genômicos, ou não-clássicos, dos hormônios esteroides (FALKENSTEIN *et al.*, 2000). Em função de sua natureza não-genômica, tal tipo de efeito é capaz de se manifestar também em tipos de células desprovidos de núcleo funcional, tais como eritrócitos, plaquetas e espermatozóides (LÖSEL *et al.*, 2003). Considerável controvérsia ainda existe no que tange aos tipos de receptores e interações envolvidos nos efeitos não-genômicos de esteroides. Postula-se a hipótese de ocorrência de efeitos não-específicos, os quais seriam desencadeados por ligação dos esteroides a receptores de membrana, assim também como já foram identificados alguns receptores associados especificamente aos efeitos não-genômicos de esteroides, ainda existindo a hipótese adicional de que vias de transdução não-genômica sejam capazes de modular a transcrição gênica mediada por receptores clássicos (LÖSEL *et al.*, 2003). A figura 2 esquematiza as vias

genômicas e não-genômicas postuladas para a ação de hormônios esteroides, assim também como a hipótese de interação entre ambos os mecanismos.

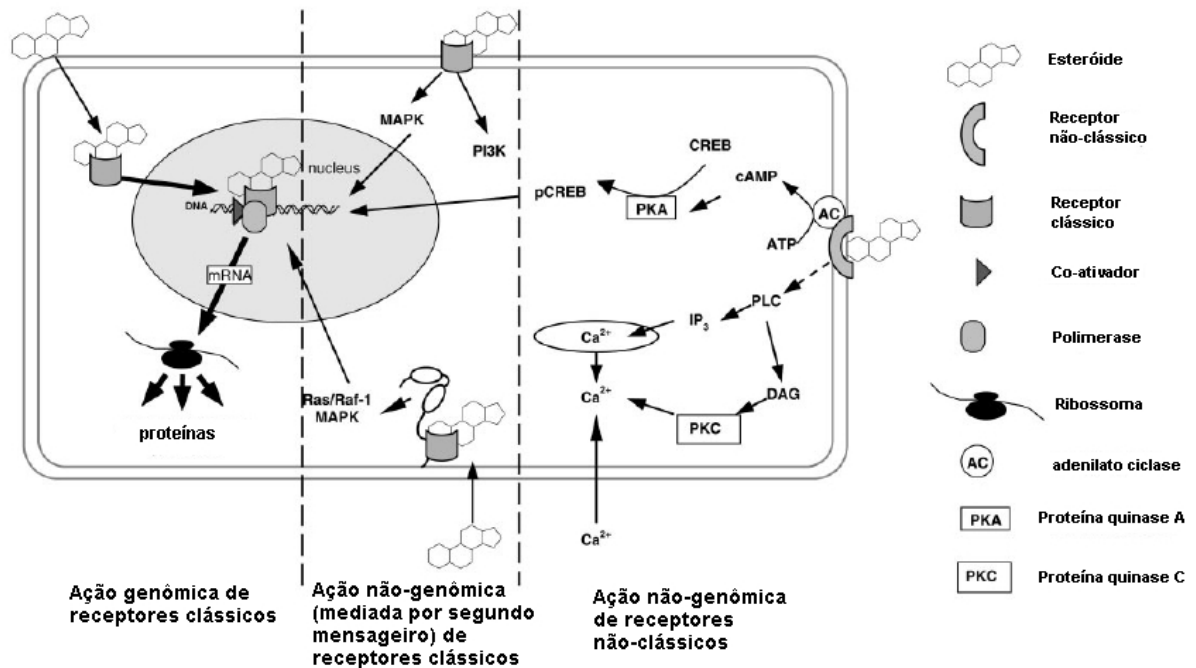


Figura 2. Esquema ilustrativo da interação entre vias genômicas e não-genômicas para a ação de hormônios esteroides (Modificado de LÖSEL *et al.*, 2003).

1.4 Aplicação Clínica x Abuso de Esteroides Anabólicos

O início da utilização de esteroides anabólicos na prática clínica data da década de 1940, período no qual eram aplicados no tratamento de traumas, queimaduras, na recuperação pós-procedimentos cirúrgicos, entre outras aplicações (BASARIA *et al.*, 2002). Também foi descrita a utilização terapêutica de EA visando ao tratamento de condições como a osteoporose, hepatite alcoólica, e anemia secundária à insuficiência renal (STRAUSS & YESALIS, 1991).

Atualmente, os EA têm sido utilizados em tratamentos de reposição hormonal para indivíduos do sexo masculino que apresentam deficiência na produção de andrógenos, assim também como é descrito seu uso no tratamento de angioedema hereditário (STRAUSS & YESALIS, 1991; BASARIA *et al.*, 2002). Além disso, nos últimos anos, os EA têm sido amplamente utilizados no tratamento da caquexia secundária à AIDS e a doenças crônicas diversas, tais como a cirrose hepática, insuficiência renal crônica, câncer e doença pulmonar obstrutiva crônica (BASARIA *et al.*, 2002; BAGCHUS *et al.*, 2005).

Por algumas décadas, cientistas argumentaram que o uso de EA não levaria ao aumento de força ou massa muscular em homens saudáveis. É provável que tais resultados negativos refletissem o fato de que eram utilizadas dosagens que resultavam apenas em leves aumentos nas concentrações de andrógenos circulantes, as quais permaneciam, no entanto, dentro da faixa de normalidade (KUHN, 2002).

Friedl e colaboradores (1991) demonstraram a dependência da dose para os efeitos do enantato de testosterona e do decanoato de nandrolona sobre variáveis antropométricas e de força muscular em humanos. Após 6 semanas de tratamento, comparando-se os efeitos de doses terapêuticas com os de doses mais elevadas, os autores encontraram aumentos significativos de circunferências somente nos grupos tratados com as maiores doses, além de pequenos aumentos nos níveis de força isocinética. Deve ser destacado o fato de que, neste estudo, as doses semanais mais elevadas não correspondiam sequer ao dobro dos valores recomendados para uso clínico, o que não reflete a realidade dos padrões atuais de abuso de EA.

Deve ser ratificada a definição do termo “abuso de substâncias”, o qual pode tanto ser usado para caracterizar o uso de drogas ilícitas, quanto o uso excessivo e inapropriado de drogas lícitas, estando o abuso de EA enquadrado na segunda classificação.

1.5 Abuso de Substâncias e a Busca pelo Desempenho

1.5.1 Aspectos Históricos – Antiguidade e Idade Média

Datam da antiguidade os primeiros relatos acerca do consumo de substâncias ou alimentos tidos como ergogênicos, ou seja, potencializadores de trabalho e desempenho físico. Na Grécia Antiga, desde o século V aC já seria documentada, por exemplo, a ingestão de alimentos tais como coração de leão, fígado de veado e sementes de gergelim por atletas e guerreiros, os quais acreditariam que este tipo de prática poderia ser capaz de aumentar sua bravura, massa muscular, força e velocidade (APPLEGATE & GRIVETTI, 1997; CARPENTER, 2007).

A busca por outros tipos de “poções” visando ao aumento no desempenho, grande parte das quais apresentariam, somados aos ergogênicos, efeitos alucinógenos, também é descrita desde os tempos antigos e medievais. Relata-se que os Incas faziam da prática de mascar folhas de coca uma estratégia para estimulação e redução de fadiga, a qual os possibilitaria percorrer o trajeto compreendido entre as cidades de Cuzco e Quito (CARPENTER, 2007; DE ROSE, 2008). Relata-se que na Roma Antiga gladiadores também usariam substâncias estimulantes, a fim de minimizar os efeitos deletérios de lesões sobre o desempenho físico (VERROKEN, 2000). Na mitologia escandinava, documenta-se se que os

guerreiros Berserkers faziam uso de cogumelos alucinógenos antes das situações de combate (CARPENTER, 2007).

1.5.2 Esporte de alto rendimento e abuso na Era Moderna e Contemporânea

“Mais rápido, mais alto, mais forte”. O universalmente conhecido lema olímpico cada vez mais é passível de associação com o abuso de drogas na comunidade internacional de atletas, grande parte dos quais se submetem a riscos incalculáveis na busca pelo ideal do desempenho ilimitado. Apesar de constituir uma questão a qual carece de documentação científica e de estimativas plausíveis, as evidências apontam para o fato de que o abuso de drogas ergogênicas é uma constante entre grande parte dos atletas de alto rendimento, abuso este o qual tem sido responsável pela distorção dos limites superiores do desempenho atlético humano (NOAKES, 2004).

O primeiro relato de óbito relacionado ao consumo de drogas em esportistas data de 1886, ano no qual o ciclista Arthur Linton morreu por intoxicação por estricnina após uma corrida entre as cidades de Bordéus e Paris, França (VERROKEN, 2000; DE ROSE, 2008).

Em Jogos Olímpicos, o primeiro grave incidente por doping foi documentado na edição de 1904, em St. Louis, EUA, na qual o atleta britânico Thomas Hicks, após ingerir estricnina e bebida alcoólica, chegou próximo à morte depois de vencer a maratona (VERROKEN, 2000). Além da estricnina, podem ser também citadas, como drogas utilizadas durante as primeiras edições dos Jogos Olímpicos modernos, a heroína, a cocaína e a morfina (NOAKES, 2004).

Após a Segunda Guerra Mundial, as anfetaminas e os esteroides anabólicos tornaram-se as principais drogas de abuso entre atletas (DE ROSE, 2008). O mais antigo relato de abuso de EA data do ano de 1954, tendo sido documentado em atletas soviéticos (DE ROSE, 2008). Sabe-se que, desde então, o abuso desta categoria de drogas tem sido cada vez mais presente no mundo esportivo (CARPENTER, 2007).

Nos Jogos Olímpicos de Tóquio, em 1964, o abuso de EA foi primeiramente detectado como um importante problema desportivo. Um terço da delegação de atletismo sueca admitiu uso de EA em Munique, 1972, o que foi sucedido por números ainda mais alarmantes, referentes à edição seguinte dos Jogos (Montreal, 1976): de uma amostragem realizada nos atletas participantes das competições de atletismo, 68% admitiram o uso de EA (CARPENTER, 2007). Deve ser destacado o fato de que, essencialmente na década de 1970 e 1980, o maciço uso de EA e outras drogas ergogênicas fazia parte de programas secretos de países do bloco comunista, os quais visavam à demonstração de poder político através de resultados em Jogos Olímpicos. Neste aspecto, deve ser destacado o fato de que o programa da antiga Alemanha Oriental, o qual contava com a participação de proeminentes cientistas, era direcionado ao desenvolvimento de métodos de administração para as drogas os quais objetivavam burlar os testes de controle anti dopagem da época (FRANKE & BERENDONK, 1997).

Conforme mencionado anteriormente, a nandrolona, um dos mais populares esteroides anabólicos, foi sintetizada, primeiramente, na década de 1950 (SCHÄNZER, 1996). A nandrolona é um dos principais esteroides de abuso, tanto em não-atletas, quanto em atletas, tendo sido primeiramente detectado seu marcante uso em atletas olímpicos na década de 1980. Do total de 11 casos de

testes positivos para doping nos Jogos Olímpicos de Los Angeles, em 1984, 9 se deram por uso de nandrolona, a maioria dos casos ocorrendo em atletas de levantamento de peso (DE ROSE, 2008).

Em Seul, 1988, foi registrado, provavelmente, o caso de dopagem de maior repercussão em Jogos Olímpicos, no qual o velocista canadense Ben Johnson foi flagrado por uso do EA estanozolol, o que resultou na perda de sua medalha de ouro e recorde mundial alcançados nos 100 m rasos. Em função do fato, o primeiro lugar na prova em questão foi herdado pelo norte-americano Carl Lewis, o qual, no entanto, quinze anos mais tarde veio a ter sua vitória contestada em função da divulgação, pela imprensa, de documentos que também apontavam para o seu uso de substâncias proibidas durante as prévias olímpicas, fato que, não obstante, não acarretou sua desqualificação nos tribunais do esporte (CROWTHER, 2004).

Recentemente, teve também grande repercussão o caso envolvendo a atleta norte-americana Marion Jones, a qual admitiu, em 2007, ter feito uso do EA no período de 1999 a 2001, período este no qual, dentre outras conquistas, alcançou três medalhas de ouro olímpicas no atletismo, durante os Jogos de Sydney (TRACK, 2007).

1.6 Epidemiologia e Padrões de Abuso de Esteroides Anabólicos

1.6.1 Prevalência Global

Sabe-se que o abuso de esteroides anabólicos deixou de ser uma questão exclusiva ao universo do esporte de alto rendimento para tornar-se um problema de saúde pública global. No entanto, a real prevalência do abuso de EA é

extremamente difícil de ser obtida, tendendo a ser subestimada, tanto em populações de atletas, quanto em não-atletas, o que deve-se, essencialmente, ao fato de que a principal metodologia empregada nas pesquisas baseia-se em questionários de auto-relato, instrumento o qual é amplamente suscetível à omissão e distorção de informações, essencialmente, aquelas referentes ao abuso de substâncias. Desta forma, deve-se ratificar que todos os trabalhos a respeito da prevalência de abuso de EA, incluindo os citados nos parágrafos a seguir, devem ser interpretados com extrema cautela, pois é provável que grande parte de seus números constituam sub-estimativas.

Nos Estados Unidos, calcula-se que exista entre 1 e 3 milhões de indivíduos que tenham feito abuso de EA (SJÖQVIST *et al.*, 2008), o que corresponderia a um percentual aproximado de 0,33 a 1% da população do país. Dados recentes do principal estudo norte-americano sobre abuso de drogas em jovens (*Monitoring the Future*) apontam, no que tange ao abuso de EA, prevalências de 1,5% 1,8% e 2,2% para estudantes da oitava, décima e décima segunda séries, respectivamente (faixa de idade entre 14 e 18 anos), ficando a prevalência para jovens de 19 a 28 anos em 1,7% (JOHNSTON *et al.*, 2008). Em um trabalho de revisão publicado por Yesalis e Bahrke (2000), estimou-se prevalência de 3 a 12% para o abuso de EA, em algum período da vida, entre adolescentes secundaristas norte-americanos do sexo masculino.

Naylor e colaboradores (2001), comparando o consumo de drogas diversas entre jovens atletas e não-atletas norte-americanos, evidenciaram não haver diferença no consumo de EA entre os dois grupos estudados. Desta forma, deve-se destacar o fato de que a imagem corporal provavelmente represente um fator determinante para o abuso de EA, tendo em vista o fato de que em jovens não-

atletas, a busca por padrões estéticos parece constituir a justificativa principal para o consumo destas substâncias.

Em contrapartida, em um trabalho de revisão, Lise e colaboradores (1999) levantaram dados na literatura apontando níveis de prevalência de até 37% para o abuso de EA entre estudantes norte-americanos envolvidos em competições atléticas, o que difere dos achados de Naylor e colegas, levando-se em conta a diferença destes números comparados aos apresentados por Johnston *et al.* (2008). Em atletas de elite, estima-se que o percentual de usuários seja de 67% (*apud* FORTUNATO *et al.*, 2007). Valores extremos de prevalência foram levantados pelo fisiculturista John Grimek em 1972, ele próprio usuário de EA à época, o qual estimou que 99% dos competidores estreados no *Mr. America* daquele ano seriam usuários de EA (YESALIS *et al.*, 1993).

Em estudantes europeus, dados levantados recentemente pelo Projeto ESPAD (ANDERSSON *et al.*, 2007) apontam prevalência de 2 a 3% para o abuso de EA, valores estes similares aos encontrados pelo *Monitoring the Future* nos Estados Unidos. Números similares, variando entre 1 e 3% para jovens secundaristas, são descritos por outros estudos envolvendo europeus (suecos e britânicos), canadenses, australianos e sul-africanos (YESALIS & BAHRKE, 2000). Reforçando a idéia de que o abuso de EA tenha se tornado uma questão de saúde pública no âmbito global, deve-se destacar um recente trabalho publicado por Tahtamouni e colaboradores (2008), no qual estudaram jovens jordanianos, e demonstraram que 4,2% dos estudantes universitários questionados estavam fazendo uso de EA, sendo este percentual de uso atual aumentado para 26% na população de fisiculturistas entrevistados.

1.6.2 Prevalência no Brasil

No Brasil, é cada vez maior a discussão acerca do abuso de EA, e do impacto negativo desta prática sobre a saúde, sendo tal fato evidenciado pelo considerável aparecimento do tema em publicações não científicas (jornais e revistas) nacionais, correspondendo, no ano de 2003, a cerca de 7,4% dos artigos sobre consumo de drogas publicados no país (NOTO *et al.*, 2003).

Segundo dados do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (2002), o perfil do consumidor preferencial de EA no país consiste de indivíduos do sexo masculino, com idade entre 18 e 34 anos. Estudando praticantes de atividade física em academias no Rio Grande do Sul, Frizon e colegas (2005) traçaram o perfil típico do usuário como sendo de universitários do sexo masculino, com idade compreendida entre 21 e 25 anos, motivados pela estética e ganho de força.

Em trabalho conduzido em uma população de estudantes de Educação Física em universidades privadas no município do Rio de Janeiro, Palma e colaboradores (2007) verificaram que 19,2% desta população faz ou já fez uso de EA. Tal achado pode reiterar o papel da imagem corporal sobre o abuso de substâncias, tendo em vista o fato de que o senso comum sugere, de maneira distorcida, um determinado padrão corporal para os profissionais da área de Educação Física.

Lucas *et al.* (2006), em levantamento realizado entre estudantes da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus, estimaram prevalência de 2,1% para o abuso de EA durante a vida. Resultados similares foram encontrados por Canuto *et al.* (2006), os quais estimaram ser de 2,7% a prevalência entre calouros da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia.

Entre praticantes de atividade física em academias, níveis mais elevados para a prevalência do abuso de EA são descritos. Nesse sentido, Silva e Moreau (2003) apontaram incidência de 19%, em estudo conduzido em São Paulo, capital. Em Goiânia, foi registrada prevalência de 9% (DE ARAÚJO *et al.*, 2002), ao passo que, para cidades do interior do Rio Grande do Sul, descreveu-se abuso de EA por 6,5% dos indivíduos estudados (FRIZON *et al.*, 2005).

Em um trabalho publicado em 2004, De Micheli e Formigoni apontaram prevalência para o abuso de EA de 0,1% entre estudantes do ensino fundamental e médio do município de Barueri, São Paulo (idade compreendida entre 10 e 20 anos). No entanto, deve-se destacar o fato de que o trabalho foi conduzido exclusivamente entre estudantes da rede pública de ensino, o que, provavelmente, não representa de forma adequada o perfil sócio-econômico de indivíduos usuários de EA. Neste aspecto, Canuto *et al.* (2006) demonstraram que o consumo ilícito de drogas, incluindo EA, entre jovens de 16 a 20 anos, é predominante nas classes sociais A e B. Além disso, a faixa de idade empregada no estudo tem seu limite inferior em 10 anos, o que torna difícil a comparação com estudos internacionais, os quais, geralmente, investigam jovens a partir de 14-16 anos. Em contraste aos números levantados por De Micheli e Formigoni, Dal Pizzol e colaboradores (2006), também investigando estudantes brasileiros dos níveis fundamental e médio, no município de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, estimaram prevalência de 2,2% para o abuso de EA nesta população.

Tomando como base os dados apresentados anteriormente, pode-se concluir que o Brasil apresenta níveis de prevalência compatíveis com aqueles descritos na literatura internacional. Desta forma, pode-se afirmar que o abuso de esteroides anabólicos já constitui um problema de saúde pública em nosso país.

1.6.3 Padrões de Abuso

As dosagens típicas utilizadas por indivíduos que abusam do consumo de EA, em geral, situam-se entre 10 e 100 vezes os valores recomendados para uso terapêutico (NIDA, 2006). No entanto, já foi descrita a utilização abusiva de doses até 1000 vezes superiores às recomendadas para fins clínicos (CSA, 1988).

As principais vias de administração de EA são a intramuscular e a oral, o que varia em função da droga em questão. Em geral, os EA são administrados em ciclos com duração de 6 a 12 semanas, comumente combinando-se duas ou mais drogas, e estabelecendo-se um padrão de administração piramidal, ou seja, aumentando-se gradualmente o número de drogas, as doses, e a frequência de administração até que seja alcançado um pico, o que é seguido pelo processo inverso, ou seja, a retirada também gradual (NIDA, 2006).

A maior parte dos estudos epidemiológicos aponta o decanoato de nandrolona como o esteroide anabólico mais utilizado para fins ilícitos (DE ARAÚJO *et al.*, 2002; FRIZON *et al.*, 2005; NIDA, 2006; TAHTAMOUNI *et al.*, 2008). Devem ser também destacados outros esteroides os quais apresentam elevados índices de abuso, tais como o estanozolol (Winstrol[®]), metandrostenolona (Dianabol[®]), oximetolona (Hemogenin[®]) e ésteres de testosterona, isolados, ou em combinação (Deposteron[®], Durateston[®]). A tabela 1 descreve os principais EA de abuso identificados por um estudo epidemiológico conduzido em 209 praticantes de musculação de três grandes academias de São Paulo, capital (SILVA & MOREAU, 2003).

Tabela 1. Esteroides anabólicos utilizados abusivamente por praticantes de musculação em academias de São Paulo, capital.

| Esteróide anabólico androgênico | Usuários (%) | Ex- usuários (%) |
|--|---------------------|-------------------------|
| Estanozolol (Winstrol™) | 77 | 86 |
| Decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) | 76 | 55 |
| Propionato, fenilpropionato, isocaproato e decanoato de testosterona (Durateston®) | 71 | 32 |
| Cipionato de testosterona (Deposteron®) | 41 | 18 |
| Oximetolona (Hemogenin®) | 41 | 18 |
| Undecanoato de testosterona (Androxon®) | 41 | 14 |
| Metenolona (Primobolan™) | 18 | 18 |
| Enantato de testosterona (Testoviron™) | 6 | 5 |
| Metandrostenolona (Dianabol™) | 12 | 0 |
| Oxandrolona (Anavar™) | 12 | 0 |
| Undecanoato de boldenona (Equipoise™) | 6 | 5 |
| Trembolona (Parabolan™) | 6 | 0 |
| Mesterolona (Proviron®) | 6 | 0 |
| Não responderam | 0 | 5 |

Extraído de Silva & Moreau (2003).

1.7 Efeitos Colaterais Secundários ao Abuso de EA

O anabolismo define-se como qualquer condição na qual ocorra a retenção de nitrogênio na massa magra, seja pela estimulação da síntese de proteínas, ou pela redução em sua degradação (KUHN, 2002). Sabe-se que, apesar de apresentarem efeitos androgênicos relativamente menores do que a testosterona e seus metabólitos naturais, todos os EA apresentam também importantes efeitos androgênicos, o que acarreta efeitos colaterais diversos sobre a função reprodutiva.

Nesse sentido, o abuso de EA por indivíduos do sexo masculino associa-se a importantes alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, pois, através de mecanismo de feedback negativo, as aumentadas concentrações circulantes de andrógenos exógenos acarretam a redução na produção endógena de LH e FSH, o que, em última análise, resulta na diminuição ou supressão da produção endógena

de andrógenos pelos testículos (EVANS, 2004). Como consequências diretas destas alterações, podem ser destacadas a atrofia testicular e os distúrbios na espermatogênese (oligospermia/azoospermia), condições estas as quais geralmente são reversíveis após descontinuação, podendo as anormalidades na contagem e morfologia dos espermatozóides perdurar por um período de até seis meses (MARAVELIAS *et al.*, 2005). São também descritas a ginecomastia e reduções na libido e potência sexual (CSA, 1990; PAVLATOS *et al.*, 2001). Neste aspecto, Bickelman *et al.* (1995) descreveram o caso de um fisiculturista de 29 anos, o qual apresentou quadro de impotência sexual e perda de libido durante o abuso de EA, tendo o quadro se prolongado durante período de um ano após a última dose do ciclo de EA.

Em mulheres, os efeitos androgênicos podem se manifestar através de importantes alterações virilizantes, tais como a redução no volume dos seios, a qual é acompanhada por diminuição generalizada nos níveis de gordura corporal, amenorréia, hipertrofia clitoriana, atrofia uterina, hirsutismo, e engrossamento de voz. Além disso, deve ser destacado o efeito potencialmente teratogênico associado ao abuso de EA (MARAVELIAS *et al.*, 2005).

Como efeitos colaterais dermatológicos, afetando tanto homens quanto mulheres, destacam-se a alopecia androgenética, ou seja, a calvície de padrão masculino, o aumento na oleosidade da pele e cabelos, acne severa, dermatite seborreica e icterícia (SCOTT 3RD & SCOTT, 1992; NIDA, 2006).

No sistema músculo-esquelético, o abuso de EA pode levar à maior ocorrência de lesões músculo-tendinosas e, se consumido por jovens em idade pré-

púbere, induzir o fechamento epifisário precoce, levando à baixa estatura permanente (CSA, 1990; STRAUSS & YESALIS, 1991).

Em 1953, Skelton descreveu a ocorrência de nefroesclerose em ratos tratados com o EA metilandrostenediol. Estudos recentes, conduzidos em murinos, demonstraram aumento no peso dos rins após o tratamento com decanoato de nandrolona (FORTUNATO *et al.*, 2006; HOSEINI *et al.*, 2009). Apesar de apresentarem-se como raros, já foram documentados efeitos colaterais renais tais como a insuficiência renal aguda e o aparecimento de nefroblastoma (MODLINSKI & FIELDS, 2006).

No fígado, é bem descrita a toxicidade dos EA, sendo o seu abuso associado à redução da função hepática, à ocorrência de hepatite colestática com icterícia, cistos hepáticos hemorrágicos, hepatomas benignos e, potencialmente, tumores hepáticos malignos (CSA, 1990). Recentemente, em um estudo de caso, foi proposto que o abuso de EA pode aumentar o risco de transformação de adenomas hepáticos em carcinomas hepato-celulares (GORAYSKI *et al.*, 2008).

Em um trabalho recente, conduzido em 11 fisiculturistas, foi demonstrado efeito genotóxico secundário ao abuso de EA, o que foi evidenciado através do aumento na frequência de células micronucleadas da mucosa bucal no grupo de usuários, os quais foram estudados durante um ciclo de EA (TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007).

1.7.1 Síndromes e Sintomas Psiquiátricos

É descrita a associação entre o abuso de EA e a ocorrência de síndromes e sintomas psiquiátricos, tais como o aumento na agressividade, comportamento

psicótico, mania, hipomania e depressão (RUBINOW & SCHMIDT, 1996). Hannan *et al.* (1991) observaram aumento nos níveis de hostilidade e agressividade em indivíduos tratados por seis semanas com testosterona ou decanoato de nandrolona. Em relação à depressão, adicionalmente aos períodos de abuso dos EA, é também descrita a manifestação dos sintomas depressivos nos períodos de abstinência destas substâncias (THIBLIN *et al.*, 1999).

Deve ser ainda destacada a dismorfia muscular, um distúrbio da imagem corporal prevalente em usuários de EA, o qual é caracterizado pela constante sensação de necessidade por aumento na massa corporal, mesmo em indivíduos extremamente hipertrofiados (KANAYAMA *et al.*, 2008). A dependência do abuso de EA parece ter íntima associação com a dismorfia muscular, a qual também denominada “síndrome da anorexia nervosa reversa”, tendo em vista o fato de que, em indivíduos afetados pela síndrome, a idéia de perda de massa muscular pode desencadear o aparecimento de transtornos de ansiedade e de distúrbios relacionados à auto-estima (OLIVARDIA *et al.*, 2000; BROWER, 2002; KANAYAMA *et al.*, 2008). A dependência fisiológica e psicológica aos EA foi documentada em usuários crônicos (BROWER, 2002), e tem sido corroborada por estudos experimentais conduzidos em modelos animais (WOOD, 2008). Deve ser também mencionado o fato de que há evidências de que o abuso de EA possa conduzir ao abuso e dependência de outras substâncias psicoativas (KANAYAMA *et al.*, 2008).

Conforme citado no parágrafo anterior, Olivardia e colaboradores (2000) demonstraram, em uma população de levantadores de peso, que a dismorfia muscular está associada ao abuso de esteroides anabólicos e à ocorrência de transtornos de ansiedade. Entretanto, estudos realizados em ratos apontam resultados divergentes, no que tange à questão da ansiedade em modelos de

tratamento com altas doses de andrógenos, quando estudada pelo método do labirinto em cruz elevado. Bitran *et al.* (1993) descreveram efeito ansiolítico após tratamento de uma semana com proprionato de testosterona, efeito este o qual foi eliminado ao final da segunda semana de tratamento. Em concordância com os achados de Biltran, outros grupos também descreveram efeitos ansiolíticos para a testosterona e a nandrolona (EDINGER & FRYE, 2005; KOUVELAS *et al.*, 2008). Em contrapartida, Rocha *et al.* (2007), utilizando protocolo de tratamento crônico por seis semanas, encontraram um aumento nos níveis de ansiedade em seu grupo de animais tratados com decanoato de nandrolona, em comparação ao grupo controle.

Por fim, deve-se destacar o fato de que já foi demonstrado aumento na frequência de ideação suicida em usuários de EA, comparados a não-usuários (BOLDING *et al.*, 2002). Nesse sentido, foi também evidenciado que os sintomas psiquiátricos secundários ao abuso prolongado de EA podem aumentar a probabilidade de suicídio em indivíduos predispostos (THIBLIN *et al.*, 1999).

1.8 Esteroides Anabólicos: Abuso e Complicações Cardiovasculares

No sistema cardiovascular, diversos efeitos colaterais, secundários à associação entre o abuso de esteroides anabólicos e o treinamento de força intenso, são propostos, destacando-se a indução de hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, dislipidemia, aterosclerose, trombose, vasoespasmo, infarto agudo do miocárdio e morte súbita por eventos arrítmicos (KENNEDY & LAWRENCE, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1998; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1999; FINESCHI *et al.*, 2001; GAUTHIER, 2001). Nas sub-seções seguintes, informações sobre o impacto cardiovascular do abuso de

esteroides anabólicos, e sua associação com a morte súbita cardíaca, serão apresentadas em maiores detalhes.

1.9 Morte Súbita Cardíaca

É definida como morte súbita cardíaca (MSC) a morte, por causa cardíaca (taquiarritmia/fibrilação ventricular, assistolia ou evento de origem não arritmica), que ocorra fora do ambiente hospitalar, instantaneamente, ou em um período igual ou menor a uma hora a partir do aparecimento de sintomas (GOLDBERGER *et al.*, 2008). Nas doenças cardíacas, a MSC constitui importante manifestação letal, sendo sua prevalência aumentada em pacientes com condições tais como doença arterial coronariana, cardiomiopatia, distúrbios no ritmo cardíaco, ou doença cardíaca hipertensiva (ZHENG *et al.*, 2001).

Na maior parte dos casos, o mecanismo responsável pela MSC é a taquiarritmia ventricular, com rápida progressão para a fibrilação ventricular e colapso circulatório (ZHENG *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos, Zheng e colaboradores (2001) registraram incidência média anual de 400 mil a 450 mil mortes súbitas cardíacas, no período compreendido entre 1989 e 1998.

A morte súbita pode ocorrer em atletas jovens durante ou imediatamente após exercício extenuante, sendo que em 97% dos casos ela está associada a anormalidades estruturais cardiovasculares (MARON *et al.*, 1980). A causa mais comum de morte súbita em atletas jovens é a cardiomiopatia hipertrófica, a qual é uma condição caracterizada pela hipertrofia cardíaca assimétrica, com a ocorrência de padrões de desarranjo e desorganização na disposição das fibras do ventrículo esquerdo, além de alterações valvulares (MARON, 1997). A morte súbita na

cardiomiopatia hipertrófica ocorre, principalmente, por arritmias decorrentes dos circuitos de reentrada, os quais são estabelecidos em consequência da desorganização na arquitetura do miocárdio ventricular (MARON, 2003).

1.10 Esteroides Anabólicos e Morte Súbita Cardíaca

1.10.1 Complicações Vasculares

A hipertensão arterial é tida como um efeito colateral direto secundário ao abuso de EA (SULLIVAN *et al.*, 1998), tendo sido primeiramente descrita, em modelo animal, na década de 1950 (SKELTON, 1953). Estudando uma população de indivíduos treinados, Grace *et al.* (2003) descreveram o aumento nos níveis de pressão arterial média e diastólica, além do duplo produto, no grupo de usuários, quando estes se encontravam durante um ciclo de EA. Na literatura, é também relatada a hipertensão arterial sistólica como consequência do abuso de esteroides anabólicos (D'ANDREA *et al.*, 2007).

São descritos efeitos adversos do abuso de EA sobre a reatividade vascular, tendo sido demonstrada redução na vasodilatação dependente (EBENBICHLER *et al.*, 2001) e independente do endotélio (LANE *et al.*, 2006). Em um estudo recente, Kasikcioglu e colaboradores (2007) descreveram menores níveis de distensibilidade aórtica em fisiculturistas usuários de EA. Em um modelo animal, foi também demonstrado que o tratamento crônico com testosterona ou nandrolona é capaz de aumentar as respostas vasoconstritoras à adrenalina, serotonina e endotelina (AMMAR *et al.*, 2004), o que dá sustentação à associação entre o abuso de EA e a maior ocorrência de vasoespasmo coronariano e infarto do miocárdio (SULLIVAN *et al.*, 1998). Em um relato de caso, a aterosclerose coronariana foi descrita como a

causa de um infarto do miocárdio fatal em um jovem fisiculturista usuário de EA (LYNGBERG, 1991), e um estudo mais recente relatou a ocorrência de infarto, acompanhado de trombo coronariano, como consequência do abuso de EA em um indivíduo treinado (GÜNES *et al.*, 2004). São também descritos casos de acidentes vasculares cerebrais isquêmicos em usuários de EA (LAROCHE, 1990; SANTAMARINA *et al.*, 2008), tendo Laroche apontado um trombo carotídeo como a origem deste evento adverso.

1.10.2 Hipertrofia Cardíaca, Alterações Estruturais e Funcionais

Há uma década, foi demonstrado que o tecido cardíaco de mamíferos, incluindo os humanos, é capaz de expressar o gene codificador do receptor androgênico (MARSH *et al.*, 1998). Os autores demonstraram que tanto a testosterona quanto a DHT desencadeiam respostas hipertróficas diretas nos cardiomiócitos.

Efeitos não-genômicos de andrógenos foram também recentemente identificados no coração. Em um estudo publicado por Vicencio e colaboradores (2006), foi descrito um aumento no cálcio intracelular desencadeado por ativação de receptores de membrana pela testosterona, sendo sugerido que tais receptores seriam associados à proteína G. Sabe-se que os níveis de Ca^{2+} intracelular regulam a atividade da calcineurina, desta forma, é possível aventar a possibilidade de que efeitos não-genômicos sejam capazes de dar início às respostas de hipertrofia cardíaca desencadeadas por andrógenos (SUSSMAN *et al.*, 1998; DUNN *et al.*, 1999). Juntas, tais evidências apontam para a possível contribuição de efeitos não-genômicos à cardiotoxicidade mediada pelo abuso de EA.

No ano de 1989, naquele que, provavelmente, foi o primeiro estudo ecocardiográfico conduzido em usuários de EA, Urhausen *et al.* descreveram aumento de massa ventricular esquerda, acompanhada por pior função diastólica, no grupo de fisiculturistas que fazia abuso de EA, comparados aos indivíduos do grupo controle (fisiculturistas não-usuários). Em contrapartida, um estudo similar, publicado poucos anos depois, o qual foi conduzido em uma população de levantadores de peso, apontou não haver diferenças na massa e função cardíaca do grupo de usuários de EA, comparados aos não usuários (THOMPSON *et al.*, 1992). A maior parte dos estudos ecocardiográficos mais recentes aponta a ocorrência de hipertrofia de ventrículo esquerdo em levantadores de peso e fisiculturistas usuários de EA (URHAUSEN *et al.*, 2004; NOTTIN *et al.*, 2006; KASIKCIOGLU *et al.*, 2009), sendo as alterações de função sistólica e/ou diastólica evidenciadas por alguns trabalhos (NOTTIN *et al.*, 2006; D'ANDREA *et al.*, 2007; KASIKCIOGLU *et al.*, 2009), sem que, no entanto, exista um consenso neste aspecto (URHAUSEN *et al.*, 2004).

Além do papel da hipertrofia, postula-se que alterações na micro-arquitetura do miocárdio ventricular, caracterizadas pelo desarranjo miofibrilar, necrose tecidual, conduzindo ao estabelecimento de áreas de fibrose, entre outras anomalias, constituam o principal fator desencadeador da instabilidade elétrica cardíaca, o que resultaria na maior incidência de arritmias ventriculares e morte súbita em indivíduos com histórico de abuso de EA (SULLIVAN *et al.*, 1998). Tais alterações, as quais constituiriam o substrato morfológico da arritmogênese secundária aos EA, têm sido descritas em relatos de morte súbita cardíaca em atletas usuários destas substâncias. Naquele que foi o primeiro destes relatos de caso a ser publicado na literatura internacional, Luke *et al.* (1990) descreveram, além de pronunciada hipertrofia, focos de fibrose e necrose miocárdica no coração de um jovem

levantador de peso, o qual veio a óbito durante um treinamento. Em 1993, Kennedy & Lawrence descreveram, em dois jovens atletas usuários de oximesterona, ambos vítimas de MSC, também durante treinamento físico, evidências de cardiomiopatia hipertrófica e miocardite, sem que fossem detectadas alterações coronarianas. Em um relato recente de morte súbita em fisiculturista do sexo feminino, a fibrose, juntamente com a inflamação miocárdica, foi considerada a principal alteração suspeita pelo desencadeamento do evento arritmico fatal (THIBLIN *et al.*, 2009).

1.11 Justificativa e Hipótese

Conforme mencionado previamente, o abuso de esteroides anabólicos não mais representa uma questão exclusiva ao universo do esporte de alto rendimento, tendo, diferentemente disto, tornado-se um problema de saúde pública global. Desta forma, faz-se cada vez mais evidente a contínua necessidade pela realização de pesquisas científicas direcionadas ao estudo do impacto fisiológico do abuso de EA.

Até então, ainda é embrionário o estado da literatura científica no que concerne ao estudo dos efeitos cardiovasculares do abuso de EA em modelos animais. A partir da utilização destes modelos experimentais, é possível que o estudo de mecanismos fisiológicos, através dos quais manifestem-se efeitos deletérios do abuso de EA, seja capaz de conduzir a comunidade científica, em breve, à definitiva consolidação de um conceito de relação causa-efeito entre o abuso de EA e o aumento no risco de mortalidade cardiovascular. Como pode ser notado na sub-seção 1.10, nos dias de hoje, a maioria dos trabalhos apontando uma provável associação entre o abuso de EA e a morte súbita cardíaca ainda consiste de relatos de caso. Nesse sentido, geralmente, a partir da interpretação de

resultados de estudos histopatológicos *post mortem*, postula-se que alterações estruturais na micro-arquitetura do tecido miocárdico ventricular constituam a principal origem da arritmogênese e aumento na incidência de morte súbita em usuários de EA. A discussão apresentada por Fineschi *et al.* (2001) parece sintetizar de maneira adequada o conteúdo previamente exposto neste parágrafo, tendo o seu grupo sugerido um interessante caminho: segundo estes autores, a definitiva relação causa-efeito entre abuso de EA e toxicidade cardiovascular ainda estaria por ser estabelecida, sendo assim fundamental que pesquisas futuras fossem direcionadas à investigação dos efeitos dos EA sobre o controle neurogênico da função cardíaca.

Sabe-se que o conceito de homeostase remete à manutenção do organismo em um estado estacionário de equilíbrio dinâmico, o que é dependente da regulação interna por múltiplos mecanismos de ajuste fisiológico. Dentro desta perspectiva, a identificação de oscilações periódicas no comportamento de variáveis cardiovasculares, ao longo de dado período de tempo, foi primeiramente realizada por Stephen Hales, no ano de 1733. Somente na década de 1950, no entanto, foi descrito que tais flutuações originavam-se de fenômenos oscilatórios inerentes aos padrões de atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), feito este o qual foi realizado pelos proeminentes pesquisadores Arthur C. Guyton e Jeff W. Harris (COHEN & TAYLOR, 2002).

Em um trabalho seminal, publicado no ano de 1963, Hon e Lee demonstraram, pela primeira vez, que anormalidades no controle dinâmico da frequência cardíaca associavam-se à hipóxia fetal e ao aumento nos níveis de mortalidade fetal. Nas décadas subsequentes, demonstrou-se que alterações na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) se associavam à arritmogênese e à maior mortalidade em cardiopatas (KLEIGER *et al.*, 1987; NOLAN *et al.*, 1998),

tendo, posteriormente, este valor prognóstico sido também demonstrado na população geral (TSUJI *et al.*, 1996).

Atualmente, a análise espectral da VFC consiste em uma bem estabelecida metodologia não-invasiva para o estudo do controle autonômico cardíaco, permitindo a determinação seletiva das contribuições dos ramos simpático e parassimpático (vagal) do SNA sobre as oscilações da FC (AKSELROD *et al.*, 1981; PAGANI *et al.*, 1986; TASK FORCE, 1996). Sabe-se que o SNA, através de sua regulação, apresenta papel fundamental na manutenção da estabilidade elétrica cardíaca. A ativação simpática apresenta, no coração, efeito arritmogênico, pois reduz o período refratário efetivo ventricular, assim como o limiar de fibrilação ventricular (KOLMAN *et al.*, 1975; MARTINS & ZIPES, 1980). Em contrapartida, a ativação vagal é capaz de antagonizar tais efeitos simpáticos, desta forma constituindo um mecanismo protetor contra o surgimento de arritmias (KENT *et al.*, 1973; KOLMAN *et al.*, 1975). Desta forma, distúrbios no balanço entre a atividade tônica simpática e vagal do coração, caracterizados, essencialmente, pelo aumento no tônus simpático e a redução no tônus vagal, são associados à ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca (VANOLI *et al.*, 1991; ESLER, 1992).

Até o ano de 2002, o Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho não dispunha de metodologias para a aquisição do eletrocardiograma (ECG) em animais não-anestesiados. É documentado na literatura o fato de que o ECG registrado sob anestesia não é passível de ser utilizado para a análise da VFC, pois as flutuações na frequência cardíaca relacionadas à modulação autonômica se encontram drasticamente atenuadas nesta condição (UECHI *et al.*, 1998; MÄENPÄÄ *et al.*, 2007).

Dentro deste panorama, tornou-se evidente a necessidade pelo desenvolvimento e implementação, no laboratório, de uma metodologia acessível para a aquisição do ECG em animais não-anestesiados, a qual pudesse servir como alternativa aos dispendiosos sistemas baseados na radiotelemetria. A metodologia inicialmente desenvolvida com este fim, e aplicada nos experimentos descritos na dissertação de mestrado do autor, baseava-se no implante cirúrgico de eletródios subcutâneos, os quais consistiam de fios de aço inoxidável, encapados com cateteres de polietileno (PE50), dos quais eram expostas apenas as suas extremidades, visando à obtenção de uma derivação aproximada à DII (regiões de contato próximas ao ápice e à base do coração). Na extremidade oposta (região do dorso do animal), na altura cervical, os eletródios eram exteriorizados, através de um sistema de plugues fixados em uma base plástica, permitindo a conexão, através de cabos flexíveis, com o sistema de aquisição. Apesar de absolutamente válida para a aquisição do ECG em ratos não-anestesiados, nossa experiência com esta metodologia indicou que sua viabilidade temporal seria de aproximadamente uma semana, geralmente ocorrendo, após este período, respostas inflamatórias aos eletrodos implantados, resultando em declínio progressivo na relação sinal-ruído até que se estabelecesse a perda completa do sinal. Desta forma, nesta primeira etapa, registros eletrocardiográficos foram conduzidos apenas na oitava semana do protocolo de tratamento com DECA (ou seu respectivo veículo, no caso dos animais pertencentes ao grupo CONTROLE).

Os principais resultados descritos na dissertação de mestrado do autor foram também apresentados em artigo, publicado em 2006 no *European Journal of Applied Physiology* (Apêndice C). O referido artigo foi o primeiro a demonstrar que o tratamento crônico com altas doses de EA é capaz de resultar no estabelecimento

de disfunção autonômica cardíaca, o que pode constituir um mecanismo chave através do qual o abuso destas substâncias seja associado à arritmogênese e à maior mortalidade cardiovascular (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2006). Neste primeiro momento, a análise de VFC revelou, no grupo tratado com DECA, um significativo quadro de disfunção parassimpática cardíaca, juntamente com uma tendência de desvio do balanço simpato-vagal, na direção do predomínio da modulação simpática.

Tendo como base as informações apresentadas nos parágrafos anteriores, a motivação do trabalho surgiu à luz da perspectiva de se dar prosseguimento ao estudo do impacto do tratamento crônico com altas doses de EA sobre a dinâmica cardiovascular, aplicando-se uma abordagem de investigação do controle cardiovascular integrado. Dentro desta perspectiva, foi pressuposto que o avanço no desenvolvimento e implementação de metodologias para aquisição e processamento de sinais poderia conferir maior robustez ao modelo experimental, possivelmente resultando em uma maior sensibilidade para a detecção de eventuais alterações na modulação simpática da atividade cardíaca, como consequência do tratamento crônico com altas doses de EA. Caso confirmado, o possível envolvimento simpático seria capaz de trazer maior substrato mecânico à hipótese de associação entre o abuso de EA e o estabelecimento de uma condição fisiopatológica cardiovascular, a qual seria caracterizada, em última análise, pela maior suscetibilidade ao desenvolvimento de arritmias cardíacas e à ocorrência de morte súbita cardíaca. A partir desta perspectiva principal, delinearam-se desdobramentos, ao longo do desenvolvimento do trabalho, e foram formuladas questões secundárias, tais como: seriam as possíveis alterações na dinâmica cardiovascular, necessariamente, acompanhadas de anormalidades na função cardíaca em condições basais ou

desafiadas, ou, ao contrário, poderiam constituir uma manifestação precoce dos efeitos deletérios do abuso de EA sobre o sistema cardiovascular? Seria o tratamento crônico com EA capaz de resultar em distúrbios nos mecanismos que regem o controle da pressão arterial a longo prazo? Todos os objetivos do trabalho estão apresentados na seção que segue, incluindo, entre outros, aqueles especificamente relacionados às questões levantadas neste parágrafo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do tratamento crônico com altas doses de esteroide anabólico sobre a dinâmica cardiovascular em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do tratamento crônico com altas doses de esteroide anabólico sobre:
 1. o controle autonômico cardiovascular, através do estudo da variabilidade cardiovascular e do controle barorreflexo;
 2. o comportamento não-linear da dinâmica de frequência cardíaca, estudando sua complexidade e propriedades fractais;
 3. a função cardíaca sistólica e diastólica, e suas respostas à estimulação adrenérgica;
 4. o comportamento ingestivo de água e solução salina hipertônica.

- Desenvolver e implementar metodologias de baixo custo para aquisição de eletrocardiograma em ratos não-anestesiados.

- Desenvolver e implementar ferramentas computacionais para o estudo da variabilidade cardiovascular e barorreflexo espontâneo em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

No presente trabalho foram respeitados os preceitos do “Guia para o Uso e Cuidado de Animais de Laboratório” (Publicação do NIH Nº 85-23, revisada em 1985, EUA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (IBCCF 006).

Foram utilizados 16 ratos Wistar machos (CONTROLE, n=8; DECA, n=8), apresentando peso corporal inicial compreendido entre 200 e 250g. Ao longo de todo o período do experimento, os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (23°C) em caixas individuais de polipropileno forradas com lascas de madeira esterilizada, tendo acesso a ração e água *ad libitum*. Todo o protocolo experimental está descrito em detalhes nas seções seguintes, e sumarizado na figura 3.

As características dos animais experimentais utilizados na validação do método não-invasivo para aquisição do ECG estão apresentadas na sub-seção 3.2.1.

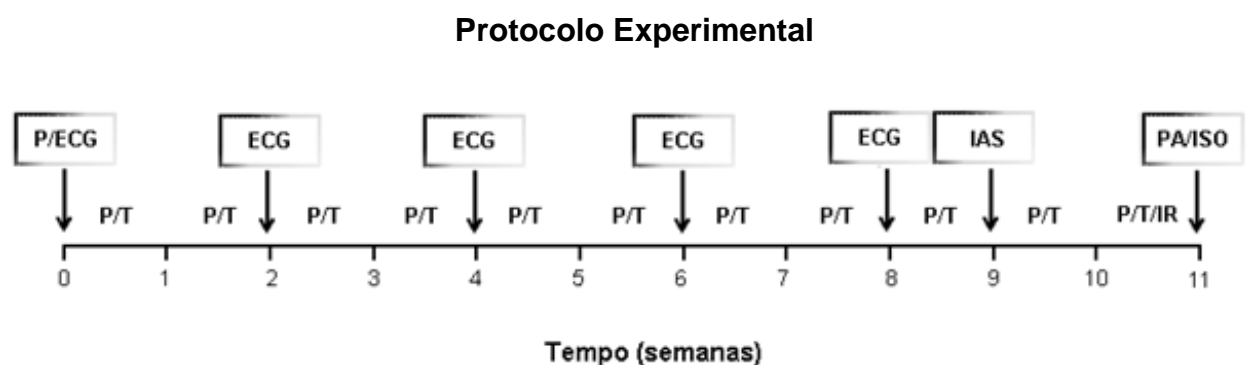
3.1.1 Protocolo de Tratamento

Para o tratamento dos animais pertencentes ao grupo DECA, foi utilizado o esteroide anabólico decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Organon Brasil), o qual foi administrado pela via intramuscular (músculo glúteo médio). Os animais pertencentes ao grupo CONTROLE receberam injeções de volume equivalente do veículo da droga [90% de óleo de amendoim / 10% de álcool benzílico (v/v)], na mesma periodicidade e localização dos animais tratados com DECA.

O tratamento crônico foi conduzido por 11 semanas, utilizando-se a frequência de uma injeção semanal por animal (10mg/kg de DECA, ou volume equivalente de veículo para o CONTROLE).

3.1.2 Medidas Biométricas

O peso corporal dos animais foi acompanhado semanalmente em balança analítica (Marte[®] A-500, Brasil). O peso do coração foi obtido após a realização dos experimentos de função cardíaca *ex vivo*, sendo expresso em termos absolutos (gramas) e relativos (mg / gramas de peso corporal).



P: Medida do peso corporal

T: Tratamento

ECG: Aquisição do eletrocardiograma no estado consciente

IAS: Medidas de ingestão de água e sal

IR: Medida da ingestão de ração

PA: Aquisição da pressão arterial no estado consciente

ISO: Estudo da função cardíaca *ex vivo* durante estimulação beta-adrenérgica

Figura 3. Diagrama esquemático do protocolo experimental.

3.2 Eletrocardiografia no Estado Não-anestesiado

Na presente tese, buscamos o desenvolvimento e implementação de metodologias para aquisição do ECG em as quais permitissem que medidas repetidas no tempo fossem realizadas, o que permitiria o estudo do curso temporal dos parâmetros da VFC ao longo do período de tratamento. Tal esforço do grupo resultou, em um primeiro momento, na implementação de um método não-invasivo para a aquisição do ECG em animais não-anestesiados, utilizando um sistema baseado na contenção dos animais. Um artigo contendo a apresentação e descrição detalhada do método foi aceito para publicação nos *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Apêndice B).

Na sequência, buscamos uma metodologia a qual fosse capaz de agregar os principais pontos positivos de cada uma das anteriores, ou seja, um método que permitisse a realização de registros repetidos do ECG ao longo do tratamento crônico, garantindo um bom nível de estabilidade do sinal e que, ao mesmo tempo, dispensasse a necessidade pela contenção dos animais. O método resultante deste esforço está descrito na sub-seção 3.2.2, e foi utilizado no principal protocolo experimental da presente tese.

3.2.1 Método não-invasivo (descrição e validação)

O método foi desenvolvido e validado em conjunto com MAROCOLO (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2009). Seis ratos (330-370g) foram habituados por 7 dias consecutivos, sendo colocados por 20 minutos diários no interior de um tubo acrílico, utilizado para contenção dos animais.

No dia anterior ao primeiro registro, a região torácica ventral de cada animal foi cuidadosamente tricotomizada. Uma vestimenta de tecido elástico em algodão foi desenvolvida de acordo com as dimensões médias da circunferência torácica dos animais, e dois pequenos eletrodos retangulares de platina (7.0 x 3.0 mm cada) foram aderidos à superfície interna da vestimenta, cada um dos eletrodos sendo soldado a um fio de comprimento suficiente para se ligar ao sistema de aquisição. A disposição espacial dos eletrodos foi realizada de maneira que a derivação resultante se aproximasse à DII, com picos proeminentes na onda R. A vestimenta pode ser observada esquematicamente na figura 4B.

Um gel condutor para ECG foi aplicado sobre cada um dos eletrodos, tomando-se cuidado para que fosse evitada a formação de uma ponte de gel entre eles. Em seguida, a vestimenta foi colocada (Figura 4A), e o animal foi contido no tubo acrílico, o qual apresentava superfícies vazadas para garantir adequada ventilação (Figura 4C). Os cabos foram conectados ao amplificador diferencial (A-M Systems, EUA) e os sinais foram adquiridos com resolução de 16 bits (Conversor A/D 1322-A, Axon Instruments, EUA) e frequência de amostragem de 10kHz. O registro do ECG sempre se iniciava 10 minutos após a contenção do animal, sendo conduzido por 5 minutos. Todos os registros foram feitos em ambiente constante durante a manhã (0700-0900h). Os sinais foram filtrados digitalmente, utilizando-se banda passante de 2-300 Hz.

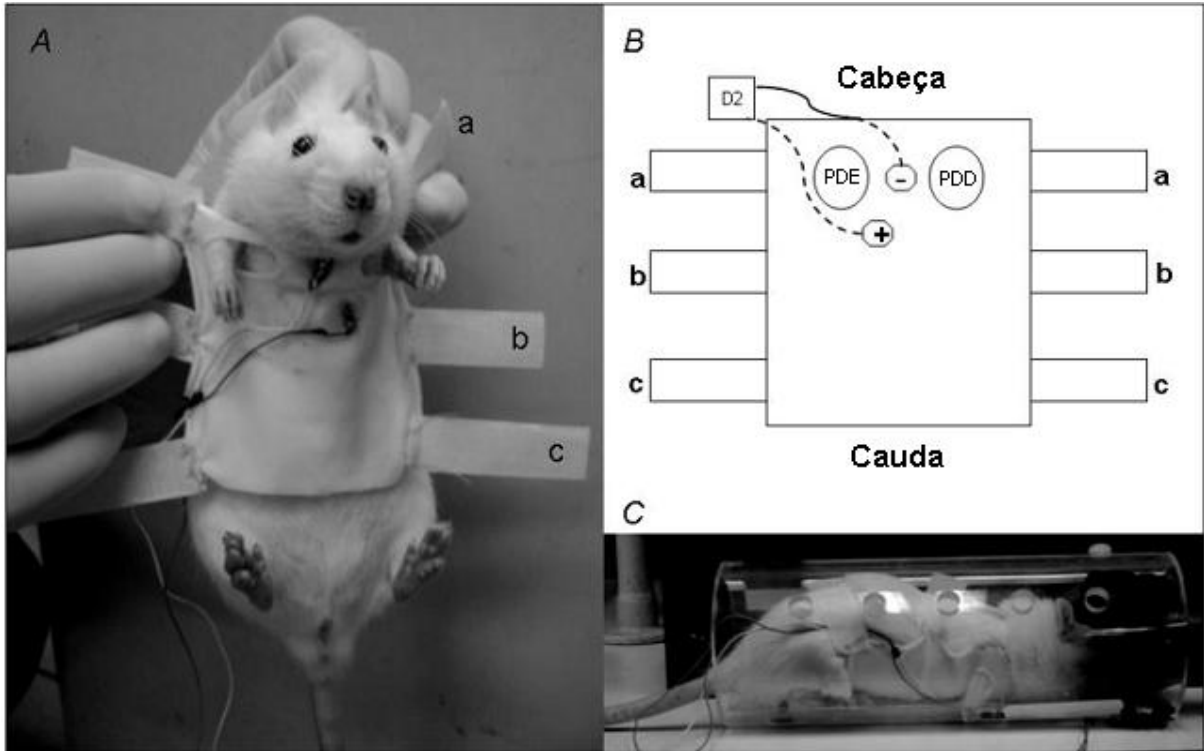


Figura 4. Método não-invasivo para aquisição do ECG em ratos não-anestesiados: A – colocação da vestimenta no rato; B – diagrama esquemático ilustrando a face interna da vestimenta, com destaque para o posicionamento dos eletrodos negativo e positivo, e posições de inserção para as patas do animal (PDE: pata dianteira esquerda, PDD: pata dianteira direita); C – animal contido em repouso durante aquisição de sinal.

Para a análise da VFC, o segmento mais estável com duração de 180s foi selecionado para cada animal. Todo o processamento de sinais foi realizado através de algoritmos próprios escritos pelo autor (PPPJ) em plataforma MATLAB (The MathWorks Company, EUA). Para a obtenção da série de intervalos (tacograma), foi utilizado um algoritmo baseado em limiar fixo, capaz de detectar o pico das ondas R presentes no ECG.

Para a análise no domínio do tempo foram obtidos os seguintes índices: RR (intervalo RR médio), SDNN (desvio padrão dos intervalos RR), RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR

sucessivos) e pNN5 [percentual de intervalos sucessivos com diferença superior a 5 ms (AUBERT *et al.*, 1999)].

Para a análise no domínio da frequência (análise espectral), os tacogramas foram reamostrados em intervalos constantes, com frequência de 10 Hz, pelo método de interpolação *spline* cúbica. Após a remoção da tendência linear, foi realizada a análise espectral das séries, utilizando-se o método do periodograma de Welch (transformada rápida de Fourier, 256 pontos, 50% de sobreposição, janela de Hamming). Posteriormente, foram calculadas as integrais de 2 bandas de frequência: baixa frequência (BF: 0,2 - 0,8 Hz, relacionada à modulação simpática, com contribuição parassimpática) e alta frequência (AF: 0,8 - 2,5 Hz, relacionada à modulação parassimpática). A razão entre as potências em BF e AF (BF/AF) foi utilizada como índice seletivo de balanço simpato-vagal no coração (PAGANI *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1991). Além dos realizados na condição basal, registros adicionais foram conduzidos sob as condições de bloqueio autonômico parassimpático (sulfato de atropina, 2 mg/kg ip) e simpático (propranolol, 4 mg/kg ip), iniciando-se 10 minutos após as injeções. Os registros com os diferentes bloqueios foram realizados em dias distintos, havendo intervalo de 48 h entre eles.

Testes t pareados foram conduzidos visando à comparação dos valores de potência espectral antes e após os bloqueios autonômicos. Para a comparação dos valores de RR médio, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de 1 via, aplicando-se o pós-teste de Bonferroni. Para todas as análises, o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

3.2.2 Metodologia Atual

O presente método se baseia em uma abordagem minimamente invasiva, e foi desenvolvido a partir de ensaios inicialmente testados em camundongos por ESPORCATTE e BRASIL no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular. (comunicação pessoal). Os animais foram anestesiados (quetamina/xilazina: 80/10 mg/kg, i.p.), e 2 pequenos anéis (diâmetro aproximado de 6 mm) de aço inoxidável 304 (fio de diâmetro 0.35 mm) eram implantados no tecido subcutâneo cirurgicamente. Os anéis foram posicionados na região dorso-lateral, ficando ambos na mesma linha axial, próximos a cada uma das axilas do animal.

A conexão com o sistema de aquisição foi feita por um cabo blindado contendo dois conectores de prensa em uma das extremidades, cada um deles fazendo contato com um dos anéis. A figura 5 ilustra a metodologia em detalhes.

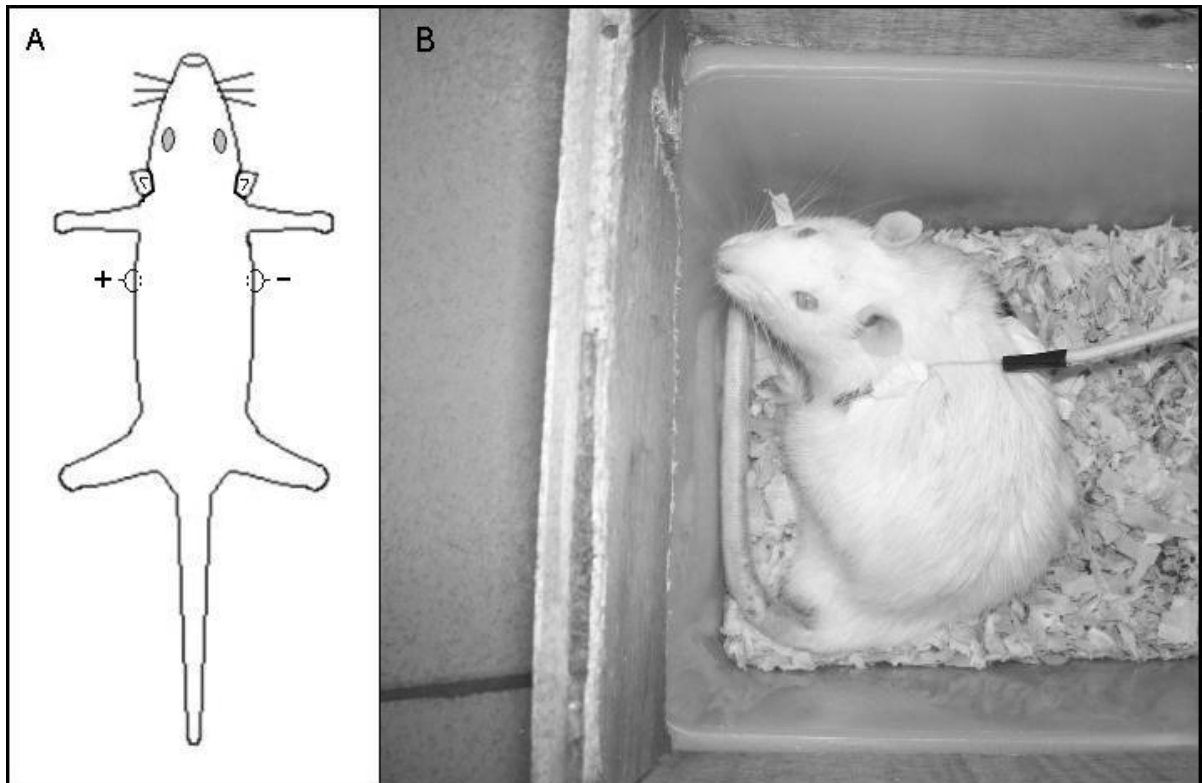


Figura 5. Metodologia minimamente invasiva atualmente aplicada para registro do ECG em ratos não-anestesiados: A – diagrama esquemático dorsal ilustrando o posicionamento dos implantes de eletrodos positivo e negativo; B - animal em repouso durante aquisição de sinal.

3.3 Aquisição do ECG

Para a aquisição do ECG no estado não-anestesiado, no presente trabalho, ratifica-se que foi utilizada a metodologia minimamente invasiva descrita na subseção 3.2.2.

Todos os registros foram realizados em um ambiente constante, no mesmo período da manhã (0600-0900h), visando à minimização de estressores externos e de possíveis variações circadianas nos mecanismos de controle da frequência cardíaca. Para todos os animais (CONTROLE, n=8; DECA, n=8) a aquisição dos sinais foi feita em medidas repetidas a cada duas semanas (Pré; Semana 2;

Semana 4; Semana 6; Semana 8), permitindo o acompanhamento do curso temporal dos efeitos do tratamento crônico com DECA, e a realização de comparações pareadas.

Passados dez minutos após a conexão, por cabo, dos eletrodos com o sistema de aquisição (amplificador diferencial A-M Systems[®]), foram iniciados os registros, os quais se estenderam por um período total de 30 minutos para cada animal. Os sinais foram adquiridos com frequência de amostragem de 1 kHz e resolução de 16 bits (conversor A/D Axon[®] 1322-A), e foram digitalmente armazenados para posterior processamento e análise. Para as análises de variabilidade da frequência cardíaca, os sinais de ECG foram filtrados digitalmente, utilizando-se banda passante de 1-240 Hz.

3.4 Aquisição da Pressão Arterial Contínua

Na semana 11 os animais foram anestesiados e conduziram-se procedimentos cirúrgicos para o implante de uma cânula arterial em cada um dos animais. As cânulas foram confeccionadas a partir de tubos de polietileno (PE10 e PE50), e foram inseridas na artéria femoral esquerda, sendo tuneladas subcutaneamente e exteriorizadas no dorso do animal, na região cervical.

Os registros foram conduzidos em ambiente constante, 24h após a realização do procedimento cirúrgico, estando os animais no estado não-anestesiado. Para a aquisição do registro contínuo de pressão arterial, o sistema de aquisição (PowerLab 400, ADInstruments[®]) foi calibrado e, em seguida, a cânula foi conectada ao transdutor de pressão (MLT0380 BP, ADInstruments[®]). Passados 10 minutos após a conexão da cânula, era iniciada, então, a aquisição do sinal, sendo conduzida por

um total de 20 minutos. Os registros foram realizados com frequência de amostragem de 1kHz e resolução de 16 bits. Os sinais foram filtrados digitalmente utilizando-se filtro passa-baixa com frequência de corte estabelecida em 30 Hz.

3.5 Dinâmica Cardiovascular

Para a identificação dos picos das ondas R do ECG, o autor utilizou detector desenvolvido por IMBIRIBA & JOFFILY. Todo o processamento de sinais foi realizado através de algoritmos próprios escritos pelo autor (PPPJ) em plataforma MATLAB (The MathWorks Company, EUA), exceção feita para os algoritmos utilizados no estudo da dinâmica não-linear da frequência cardíaca. A análise de flutuação sem tendência foi conduzida a partir da utilização do *software* Kubios HRV 2.0 (TARVAINEN *et al.*, 2008), disponível, sob solicitação, no *site* do grupo (The Biosignal Analysis and Medical Imaging Group - University of Kuopio, Finlândia), e análise de entropia aproximada foi conduzida utilizando-se algoritmo disponível para livre *download* através da base Physionet (KAPLAN & STAFFIN, 1998; GOLDBERGER *et al.*, 2000).

3.5.1 Implementação de Filtro por Subtração de Linha de Base do ECG

Conforme mencionado na seção 3.3, os sinais de ECG foram adquiridos por 30 minutos. Desta forma, levando-se em conta a longa duração dos registros, tornou-se evidente, a necessidade pela implementação de um filtro para atenuação das flutuações de linha de base do sinal eletrocardiográfico, o qual, além de efetivo neste aspecto, fosse capaz de fazê-lo com mínimas distorções temporais no sinal,

viabilizando assim a utilização de detector de picos (ondas R) baseado em limiar (utilizou-se um detector de picos o qual permitia o ajuste manual do limiar de voltagem).

Sabe-se que a aplicação de filtro passa-alta com alto valor de frequência de corte resulta no aparecimento de distorções temporais no sinal do ECG, o que tem como consequência a possível inácurácia na detecção temporal dos picos das ondas R. Com base nesta informação, foi implementado pelo autor, em plataforma Matlab, um filtro não-linear baseado na subtração da linha de base do ECG, tomando-se como referência a proposta metodológica descrita por Keselbrener *et al.* (1997).

Basicamente, para cada ECG foi gerado um sinal de linha de base, através de aplicação de filtro passa-baixa em 7 Hz sobre o sinal original [nesta sub-seção, o termo “sinal original” refere-se ao ECG previamente filtrado (1-240 Hz), conforme descrito na seção 3.7]. Em seguida, os sinais originais foram subtraídos de suas respectivas linhas de base, sendo os sinais resultantes (sinal original – linha de base) finalmente submetidos ao processo de detecção dos picos das ondas R, visando à geração dos tacogramas. Conforme mencionado previamente, foi utilizado um detector de picos o qual permitia o ajuste manual das voltagens de limiar em diferentes trechos do sinal. O procedimento de filtragem por subtração apresentou-se como uma estratégia de grande aplicabilidade, minimizando drasticamente a necessidade por ajuste manual nos limiares de detecção ao longo do sinal. A figura 6 refere-se a um trecho de sinal de 5,5 segundos, contendo marcantes flutuações de linha de base, o qual foi extraído do ECG adquirido em um animal pertencente ao grupo CONTROLE na semana 4 do protocolo experimental (escolha aleatória). A

figura ilustra o sinal original, a linha de base, e o sinal resultante da aplicação do filtro por subtração de linha de base para o trecho em questão.

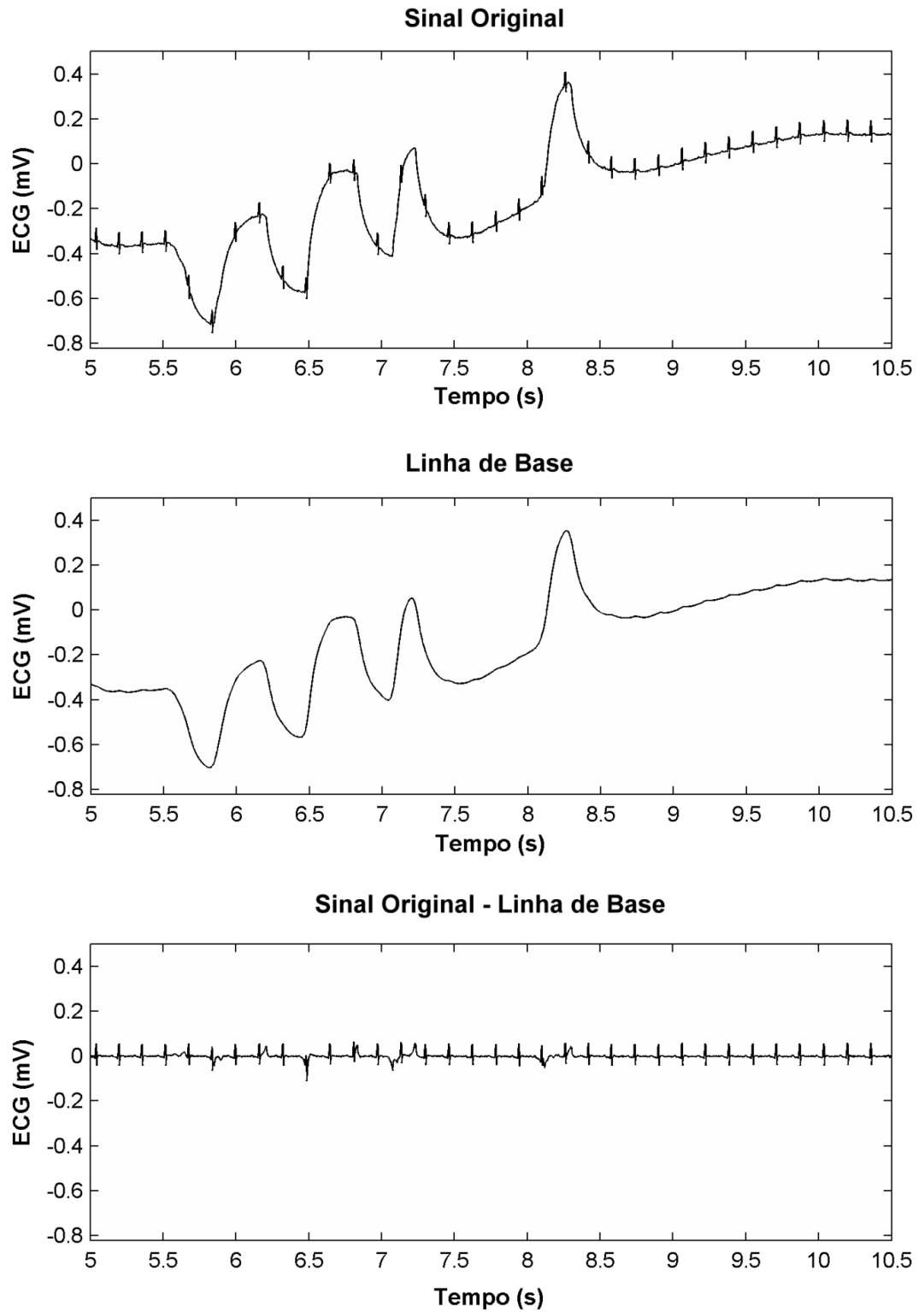


Figura 6. Superior: Trecho do sinal de ECG original, contendo flutuações na linha de base; Meio: Linha de base do trecho, obtida pela aplicação de filtro passa-baixa (7 Hz) no sinal original; Inferior: Sinal resultante da aplicação do filtro por subtração de linha de base para o trecho em questão.

A fim de testar o desempenho do filtro por subtração de linha de base, comparativamente, em relação à aplicação simples de filtro passa-alta (7 Hz) em todo um sinal, foi realizada comparação do impacto de cada procedimento sobre os valores de RR detectados, utilizando-se o método da plotagem de Bland-Altman. Para tal, foi utilizado o sinal de ECG ilustrado na figura 6. O tacograma obtido a partir do ajuste manual das voltagens de limiar, ao longo de todo o trecho do sinal original, foi considerado o padrão-ouro para que se realizassem as comparações com cada uma das metodologias.

Conforme observa-se na figura 7, na qual é ilustrada a comparação dos métodos através de plotagem de Bland-Altman, o filtro por subtração de linha de base apresentou desempenho altamente superior ao do filtro passa-alta, ratificando ser uma metodologia capaz de fornecer tacogramas muito mais próximos àqueles obtidos a partir do ajuste manual do limiar de voltagem no sinal original (padrão-ouro). Desta forma, a aplicação do filtro por subtração de linha de base fez parte do pré-processamento de todos os sinais de ECG estudados.

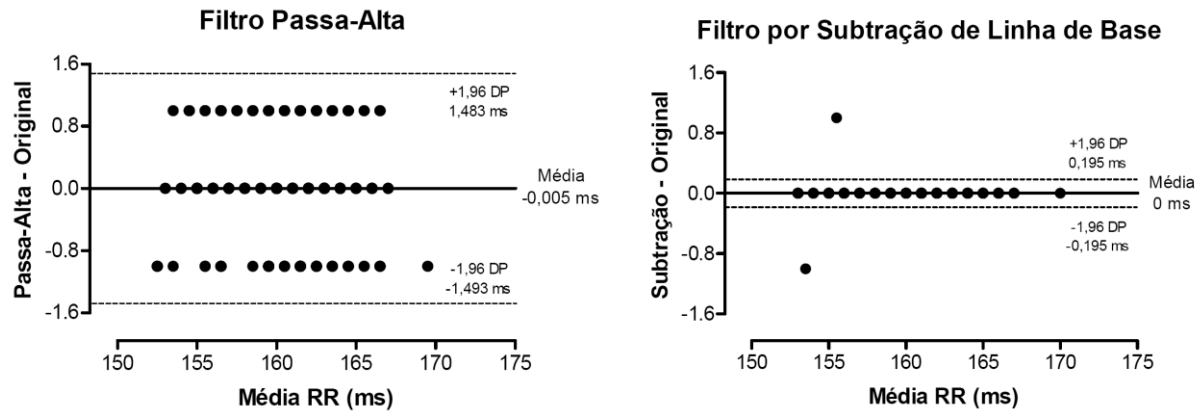


Figura 7. Plotagem de Bland-Altman comparando os valores de RR obtidos, para o segmento, após aplicação de cada uma das abordagens de filtragem do ECG. Esquerda: Detecção após aplicação de filtro passa-alta vs. detecção por ajuste manual das voltagens de limiar no sinal original; Direita: Detecção após aplicação de filtro por subtração de linha de base vs. detecção por ajuste manual dos limiares de voltagem no sinal original.

3.5.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca – Métodos Lineares

A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi realizada respeitando-se as determinações da Força-Tarefa da Sociedade Européia de Cardiologia e Sociedade Norte-Americana de *Pacing* e Eletrofisiologia (TASK FORCE, 1996). Como referencial metodológico para a análise de VFC em ratos, foi também considerado o trabalho de Aubert *et al.* (1999). A análise de VFC foi conduzida em conjuntos de dados contínuos com 20 minutos de duração, os quais foram selecionados a partir dos registros iniciais de 30 minutos, em função da estabilidade do sinal.

Após detecção dos picos das ondas R (e subsequente geração dos tacogramas), nos casos em que foi necessária a realização de edição, a interpolação de eventos (batimentos ectópicos e artefatos de interferência elétrica) foi conduzida em menos de 1% do total de intervalos RR detectados.

Para a análise no domínio do tempo foram obtidos os seguintes índices: RR (intervalo RR médio), SDNN (desvio padrão dos intervalos RR) e RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR sucessivos).

Para a análise no domínio da frequência (análise espectral), os tacogramas foram reamostrados em intervalos constantes, com frequência de 10 Hz, pelo método de interpolação *spline* cúbica. Após a remoção da tendência linear, foi realizada a análise espectral das séries, utilizando-se o método do periodograma de Welch (transformada rápida de Fourier, 512 pontos, 50% de sobreposição, janela de Hanning). Posteriormente, foram calculadas as integrais de duas bandas de frequência: baixa frequência (BF: 0,2 - 0,8 Hz) e alta frequência (AF: 0,8 - 3 Hz). A razão entre as potências em BF e AF (BF/AF) foi utilizada como índice seletivo de balanço simpato-vagal no coração (PAGANI *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1991).

3.5.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca – Métodos Não-lineares

Para o estudo da dinâmica não-linear da frequência cardíaca, foram utilizados tacogramas contendo 7000 intervalos RR, conforme previamente descrito para análises não-lineares de VFC em ratos (BECKERS *et al.*, 2006).

A análise de flutuação sem tendência (DFA) foi conduzida tomando-se como base a metodologia inicialmente descrita por Peng *et al.* (1995b). Sabe-se que a DFA quantifica as propriedades fractais (auto-correlação) da série temporal, englobando correlações de curto e longo prazo. Basicamente, a flutuação RMS dos dados integrados e sem tendências foi mensurada dentro de janelas de vários comprimentos e, em seguida, plotada contra o comprimento da janela em uma

escala log-log, sendo o expoente escalar ($DFA\alpha$) indicativo da inclinação da reta em questão. É sabido que o expoente escalar é considerado um parâmetro de auto-similaridade. No presente trabalho, foram calculados os expoentes escalares de curto ($DFA\alpha_1$: 4-16 intervalos RR) e longo prazo ($DFA\alpha_2$: 16-64 intervalos RR), sabendo-se que valores de α próximos de 1 são indicativos de comportamento escalar (PENG *et al.*, 1995a; BECKERS *et al.*, 2006).

Sabe-se que o conceito de entropia remete às propriedades de complexidade de um determinado sistema. A análise da entropia aproximada (ApEn) de uma série temporal foi inicialmente descrita por Pincus (1991). No presente trabalho, a ApEn foi calculada a partir da fórmula de Pincus, utilizando-se valores de entrada fixos para o fator do filtro ($r=15\%$) e para a dimensão de imersão ($m=2$) (BECKERS *et al.*, 2006). Conforme mencionado previamente, valores de ApEn mais elevados são indicativos de maiores níveis de complexidade na estrutura do sinal.

3.5.4 Variabilidade da Pressão Arterial

Para a análise da variabilidade da pressão arterial (VPA), foram utilizados como referência os valores de pico em cada ciclo cardíaco [pressão arterial sistólica (PAS)]. Após detecção, foram geradas séries temporais de 5 minutos, contendo todos os valores de PAS no segmento. Para cada animal, o segmento contínuo de 5 min a ser analisado foi selecionado em função da estabilidade do sinal, a partir do registro original de 20 minutos.

Para a análise no domínio do tempo, foram obtidos os seguintes índices: PAS (PAS média) e VPA total (desvio padrão da PAS). Para a análise no domínio da frequência (análise espectral), as séries de PAS foram reamostradas em intervalos

regulares, com frequência de 10 Hz, pelo método de interpolação *spline* cúbica. Após a remoção da tendência linear, foi realizada a análise espectral das séries, utilizando-se o método do periodograma de Welch (transformada rápida de Fourier, 512 pontos, 50% de sobreposição, janela de Hanning). Posteriormente, foram calculadas as integrais de 2 bandas de frequência: baixa frequência (BF: 0,2 - 0,8 Hz) e alta frequência (AF: 0,8 - 3 Hz).

3.5.5 Sensibilidade Barorreflexa

Para o estudo da sensibilidade barorreflexa, foram utilizados os mesmos conjuntos de dados de PAS (5 min) usados para as análises de VPA. Adicionalmente, foram também geradas séries temporais contendo todos os valores de intervalos de pulso (IP; intervalos de tempo entre picos de PAS em cada ciclo cardíaco) contidos no mesmo segmento de 5 minutos.

A atividade barorreflexa foi avaliada através da investigação da sensibilidade do barorreflexo espontâneo. Diferentemente do método clássico (Oxford), no qual a atividade do barorreflexo é quantificada pela magnitude das respostas de frequência cardíaca às variações de PA, as quais são mediadas pela infusão de drogas vasoativas em doses crescentes, os métodos de avaliação do barorreflexo espontâneo não dependem de qualquer intervenção externa no sistema cardiovascular. A avaliação da sensibilidade do barorreflexo espontâneo é realizada através da aplicação de métodos computacionais, e baseia-se no acoplamento entre as flutuações da pressão arterial e dos intervalos de pulso, quantificando-se a magnitude das variações nos IP, as quais ocorrem em função da magnitude das flutuações na PA.

Sabe-se que a análise do barorreflexo espontâneo consiste em uma metodologia robusta para avaliação da sensibilidade barorreflexa em sua faixa de operação natural, fornecendo índices que se correlacionam de maneira consistente com aqueles extraídos pela aplicação do método clássico (PARLOW *et al.*, 1995). O método espontâneo, por dispensar a infusão de drogas para sua realização, apresenta ainda importante vantagem adicional em relação ao método clássico no que tange à interpretação de resultados, pois é sabido que os compostos vasoativos utilizados nos ensaios clássicos podem apresentar efeitos diretos sobre os receptores cardiopulmonares e sobre o nodo sino-atrial (PARATI *et al.*, 2000).

Para o estudo do barorreflexo espontâneo pelo método de sequências, basicamente, o algoritmo realizou busca por sequências (crescentes ou decrescentes) de 3 ciclos cardíacos, nas quais houvesse incremento ou decréscimo concomitante entre os valores de PAS e IP. Em seguida, para cada sequência computada, foi conduzida regressão linear entre as variáveis, sendo consideradas válidas as sequências cujos valores de r fossem superiores a 0,85. Não foi utilizado atraso temporal de batimentos (*lag*) entre as variáveis IP e PAS para a construção das sequências (BECKERS *et al.*, 2006). O ganho, ou índice de sensibilidade barorreflexa para cada animal, consistiu do valor médio do coeficiente angular (em módulo) obtido para cada uma das sequências computadas, sendo expresso em ms/mmHg.

A sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi também estudada através da análise espectral. Para esta abordagem, além do cálculo do espectro referente à série temporal de PAS, descrito na sub-seção 3.5.4, foi aplicada a mesma metodologia sobre a série temporal de IP (FFT, 512 pontos, 50% de sobreposição,

janela de Hanning). Em seguida, foi conduzida análise de coerência entre os sinais, visando ao estudo da correlação entre as oscilações de IP e PAS. Sabe-se que o módulo da coerência ao quadrado (k^2) apresenta-se de maneira similar ao coeficiente de correlação, variando entre o valor de 0 (nenhuma relação) e 1 (completa coerência) (PONIKOWSKI *et al.*, 1997). A sensibilidade barorreflexa foi extraída através do índice alfa, o qual é calculado como a raiz quadrada da razão entre as potências espectrais de IP e PAS (PAGANI *et al.*, 1988). Os valores de índice-alfa foram calculados separadamente para cada uma das bandas de frequência (BF: 0,2 - 0,8 Hz; AF: 0,8 - 3 Hz), sendo considerados para a análise apenas os animais os quais apresentaram valores de $k^2 > 0,4$ (CERUTTI *et al.*, 1994) ao longo do comprimento de ambas as bandas.

A figura 8 apresenta um diagrama esquemático ilustrando a metodologia empregada na extração da sensibilidade do barorreflexo espontâneo por análise espectral.

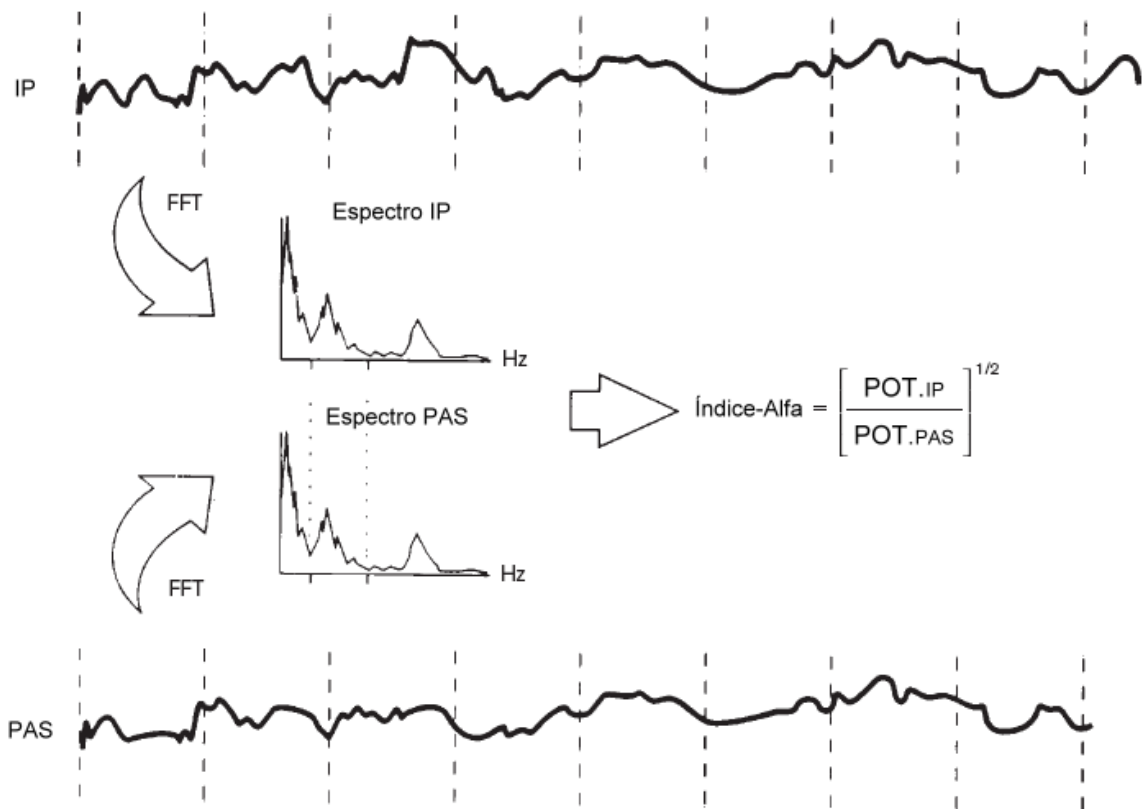


Figura 8. Diagrama esquemático ilustrando a metodologia empregada na extração da sensibilidade do barorreflexo espontâneo por análise espectral. IP: Intervalos de Pulso; PAS: Pressão Arterial Sistólica; POT: Potência Espectral; FFT: Transformada Rápida de Fourier. Modificado de PARATI *et al.* (2000).

3.6 Avaliação da Função Cardíaca *ex vivo*

Na semana 11 do protocolo experimental, após terminadas todas as aquisições de dados *in vivo*, os ratos foram anestesiados (quetamina/xilazina: 80/10 mg/kg, i.p.), e sacrificados por deslocamento cervical. Rapidamente, foi realizada a excisão do coração, que foi canulado pela artéria aorta através de um sistema de Langendorff modificado, sendo perfundido (fluxo constante de 10 mL/min) com solução Krebs-Henseleit modificada, contendo NaCl 118mM, KCl 4,7mM, NaHCO₃ 25mM, MgSO₄ 1,2mM, KH₂PO₄ 1,2mM, glicose 11mM, CaCl₂ 1,25mM, borbulhada

continuamente com mistura carbogênica (95% O₂ - 5% CO₂), e mantida à temperatura de 37°C. Um balão de látex foi introduzido no ventrículo esquerdo através da válvula mitral, permitindo a aquisição dos registros de pressão intraventricular (transdutor de pressão MLT0380 BP, PowerLab 400, ADInstruments®, EUA). Os corações foram mantidos imersos na solução de perfusão, e a pressão diastólica foi estabelecida em 10 mmHg.

Após período de estabilização de 20 minutos, foi adquirido o traçado basal de pressão intraventricular. Em seguida, foi realizada estimulação adrenérgica através da perfusão de concentrações crescentes do beta-agonista isoproterenol (ISO: 10⁻⁸ - 10⁻⁶ M), o qual foi diluído na solução de Krebs-Henseleit modificada. Após a perfusão com cada concentração de ISO, a preparação era lavada, perfundindo-se o coração com a solução Krebs-Henseleit modificada.

As análises foram realizadas utilizando-se o *software* Chart 4 (ADInstruments, EUA) e, para cada um dos animais, tanto na condição basal quanto para cada uma das concentrações de ISO, foram extraídos os seguintes índices: frequência cardíaca média (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP), pressão do ventrículo esquerdo ao fim da diástole (LVEDP), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), e os valores de pico da primeira derivada positiva e negativa de pressão no ventrículo esquerdo (+dP/dt e -dP/dt, respectivamente). Para cada uma das três concentrações de ISO aplicadas, as medidas foram realizadas no pico do efeito inotrópico (SETHI *et al.*, 2007).

3.7 Estudo do Comportamento Ingestivo

3.7.1 Ingestão de Água e Sal

O estudo do comportamento ingestivo para a água e sal foi conduzido durante a semana 9 do protocolo experimental. Além da água destilada, os animais tiveram acesso a uma solução salina (NaCl a 1,8%), a qual, normalmente, é aversiva em relação à percepção gustativa dos animais. O experimento teve início às 1900h, sendo este considerado o dia 1.

Às 1900h do dia 2, todas as garrafas foram retiradas das gaiolas de cada um dos animais, e foram realizadas mensurações dos níveis totais de ingestão basal no período de 24 h. Os animais permaneceram em privação hídrica por um período de 24 h. Às 1900h do dia 3, as garrafas, contendo água destilada e solução de NaCl a 1,8%, foram recolocadas nas gaiolas dos animais, e foram realizadas medidas seriadas dos níveis de ingestão, visando ao estudo da condição pós-privação hídrica. Foram realizadas 6 medidas (60, 120, 180, 240, 300 e 600 min) no período compreendido entre 1900-0500h. Todo o experimento foi delineado de maneira que as medidas seriadas pós-ingestão fossem conduzido no período noturno (1900-0000h), em função do típico aumento percebido na atividade sensorial visceral e no componente hedônico, neste período do dia.

3.7.2 Ingestão de Ração

A medida da ingestão alimentar foi realizada na semana 11 do protocolo experimental. Foi realizada pré-pesagem da ração e, passadas 24 h, realizou-se

nova pesagem, sendo a diferença tida como a medida da ingestão de ração em 24 h. Os resultados foram expressos em valores relativos (g / 100g de peso corporal).

3.8 Análise Estatística

As comparações transversais entre os grupos foram realizadas utilizando-se o teste *t* de Student não-pareado. Para a análise dos resultados envolvendo medidas repetidas, foi utilizada ANOVA *two-way*, tendo a comparação entre os grupos sido feita através da aplicação do teste *post-hoc* de Fisher. Para todas as análises, o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Validação do ECG Não-invasivo em Ratos Não-anestesiados

A aplicação do presente método não-invasivo permitiu a extração de sinais eletrocardiográficos de alta qualidade em animais não-anestesiados, conforme pode ser observado na Figura 9 (A), a qual ilustra um segmento de ECG não-filtrado. A presente abordagem mostrou-se viável e aplicável ao estudo da VFC nos domínios do tempo e frequência, conforme pode ser observado na Figura 9 (B) e Figura 9 (C), as quais ilustram, respectivamente, um tacograma e um espectro de potência de RR representativos. Adicionalmente, na Tabela 2 são apresentados os valores extraídos da análise de VFC para cada um dos animais estudados.

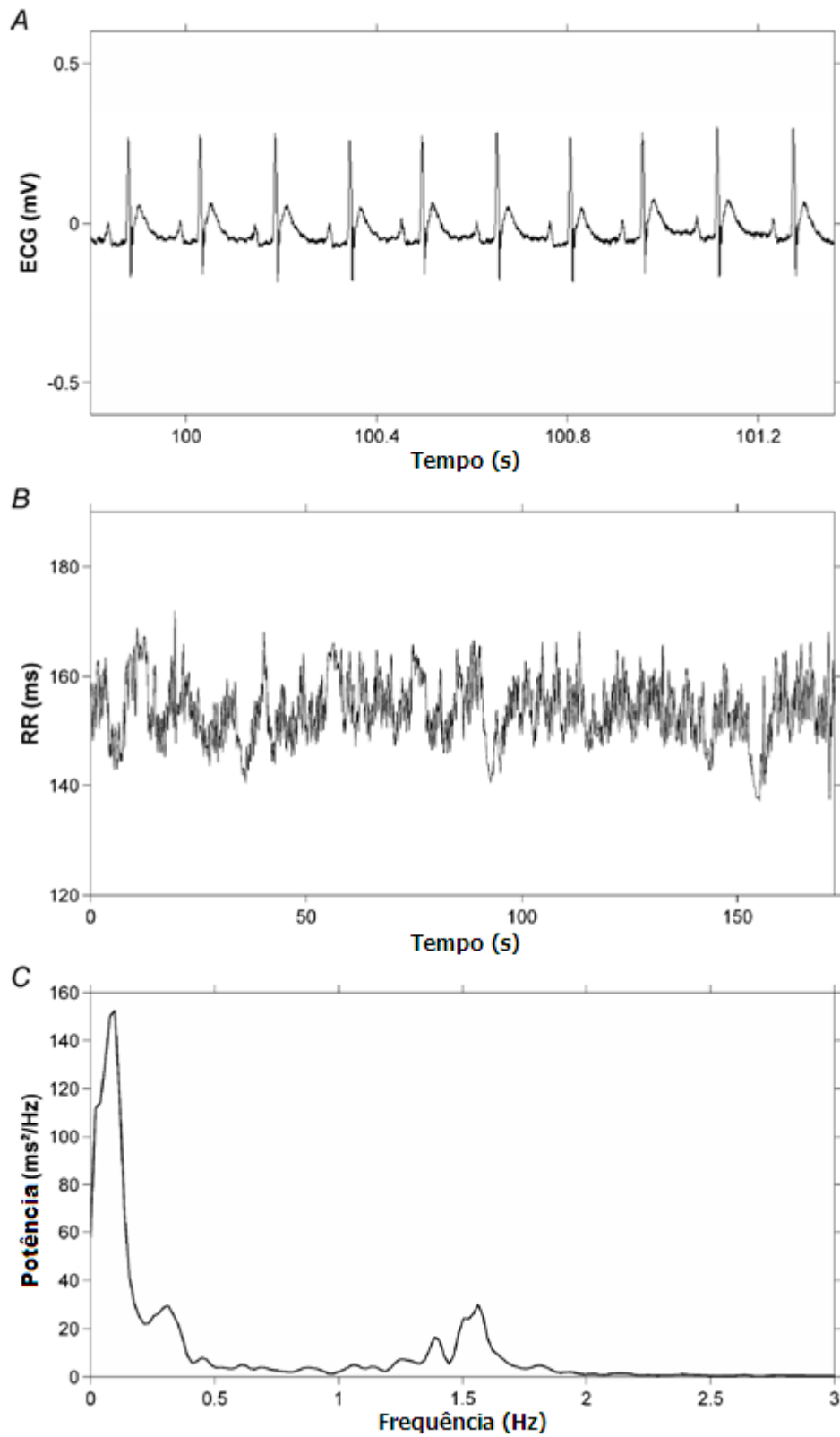


Figura 9. Gráficos de VFC extraídos de um animal representativo: A – Segmento de ECG não-filtrado. B – Tacograma. C – Espectro de potência das flutuações de RR.

Visando ao estudo das respostas da VFC a bloqueios autonômicos, foram utilizados atropina e propranolol. Conforme esperado, o valor de RR médio foi significativamente reduzido na presença do antagonista muscarínico sulfato de atropina (2 mg/kg i.p.; n=6; p<0.05), e aumentado na presença do antagonista beta-adrenérgico propranolol (4 mg/kg i.p.; n=6; p<0.001), como ilustrado na Figura 10 (A). Adicionalmente, corroborando a validade do presente método, como esperado, na presença de propranolol houve redução significativa da potência espectral da VFC em BF na banda de baixa frequência [Figura 10 (B); p<0.05], enquanto que a potência em AF foi significativamente reduzida na presença de sulfato de atropina [Figura 10 (C); p<0.05].

Tabela 2. Valores individuais de VFC.

| # Animal | RR (ms) | SDNN (ms) | RMSSD (ms) | pNN5 (%) | Pot. BF (ms ²) | Pot. AF (ms ²) | BF/AF |
|--------------|---------|-----------|------------|----------|----------------------------|----------------------------|-------|
| 1 | 153.54 | 9.89 | 5.41 | 24.40 | 14.74 | 11.30 | 1.30 |
| 2 | 149.48 | 6.23 | 3.47 | 13.72 | 3.37 | 4.33 | 0.78 |
| 3 | 147.78 | 8.40 | 4.47 | 20.79 | 9.93 | 6.69 | 1.48 |
| 4 | 153.65 | 5.85 | 4.64 | 27.81 | 5.83 | 8.71 | 0.67 |
| 5 | 147.88 | 7.78 | 2.95 | 2.71 | 5.65 | 3.30 | 1.71 |
| 6 | 146.97 | 4.94 | 3.23 | 12.83 | 4.72 | 3.19 | 1.48 |
| Média | 149.88 | 7.18 | 4.03 | 17.04 | 7.37 | 6.26 | 1.24 |
| E.P.M | 1.21 | 0.75 | 0.39 | 3.74 | 1.72 | 1.34 | 0.17 |

RR (intervalo RR médio), SDNN (desvio padrão dos intervalos RR), RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR sucessivos), pNN5 (percentual de intervalos sucessivos com diferença superior a 5 ms), Pot. BF (potência espectral na banda de baixa frequência), Pot. AF (potência espectral na banda de alta frequência), razão BF/AF.

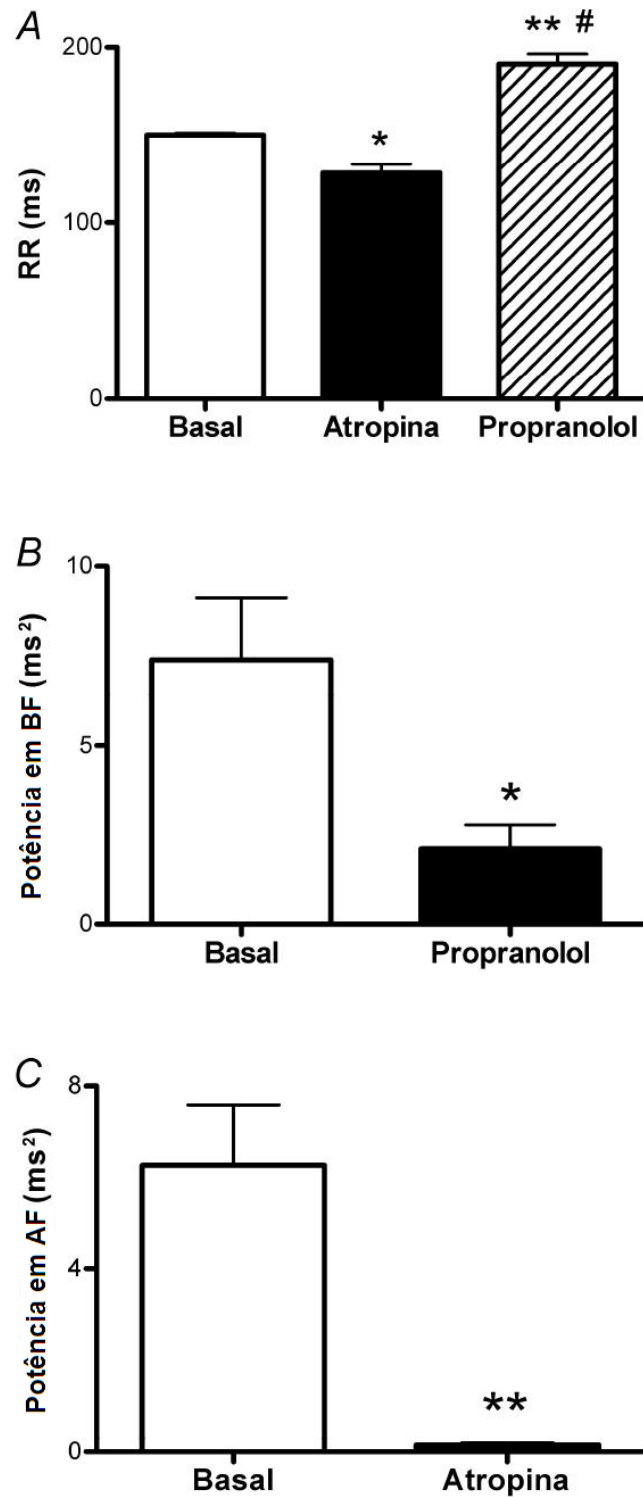


Figura 10. Resultados após bloqueios autonômicos: A – RR médio em condição basal e após injeção de atropina (2 mg/kg, i.p.) ou propranolol (4 mg/kg, i.p.). B – Potência espectral de baixa frequência em condição basal e após propranolol. C – Potência espectral de alta frequência em condição basal e após atropina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs. basal; ** $p < 0.001$ vs. basal; # $p < 0.001$ vs. atropina. Para todas as condições, $n = 6$.

4.2 Efeitos do Tratamento com DECA sobre o Peso Corporal e Cardíaco

O efeito do tratamento com DECA sobre o peso corporal dos animais pode ser observado na Figura 11. Não houve diferenças entre os grupos para os pesos corporais iniciais médios. O tratamento crônico com DECA foi capaz de impedir o aumento de peso corporal dos animais ao longo do tratamento, conforme pode ser observado pelas diferenças estatisticamente significativas, registradas entre os grupos, a partir da semana 7. Apesar da ausência de diferenças entre os grupos para o peso absoluto final do coração, o peso relativo do coração foi significativamente maior no grupo DECA (Tabela 3).

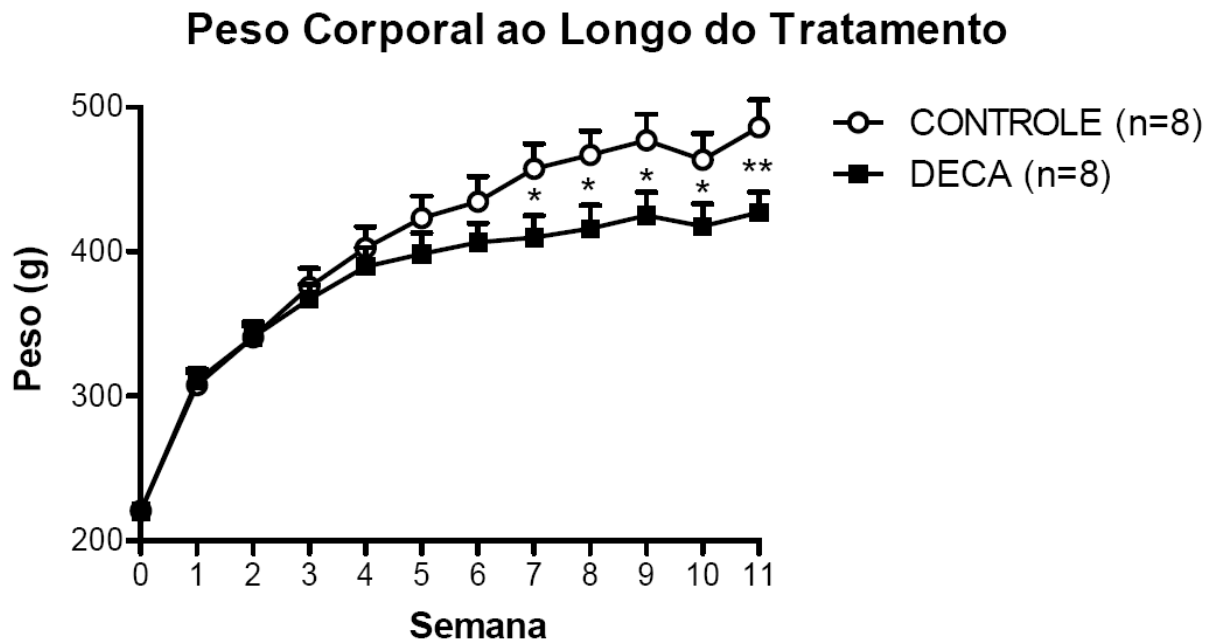


Figura 11. Evolução do peso corporal ao longo das 11 semanas de tratamento. A semana zero representa os valores basais registrados previamente ao início do tratamento com DECA ou veículo. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus CONTROLE.

Tabela 3. Efeitos do tratamento com DECA sobre o peso corporal e cardíaco dos ratos.

| | <i>Peso corporal (g)</i> | | <i>Peso final do coração</i> | |
|-----------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | Inicial | Final | Absoluto (g) | Relativo (mg/g) |
| CONTROLE (n=8) | 220,88 ± 4,70 | 485,75 ± 19,06 | 1,44 ± 0,08 | 2,96 ± 0,09 |
| DECA (n=8) | 220,25 ± 5,48 | 426,88 ± 13,96* | 1,57 ± 0,08 | 3,66 ± 0,11** |

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Peso relativo final do coração: razão do peso absoluto final do coração pelo peso corporal final. *p<0,01, **p<0.001 versus CONTROLE.

4.3 Dinâmica Cardiovascular

Conforme mencionado na seção 3.6, todas as análises de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) conduzidas no principal protocolo experimental da presente tese foram realizadas a partir da utilização do método minimamente invasivo de aquisição do ECG em ratos, descrito na sub-seção 3.2.2. Tal metodologia permitiu a realização de registros repetidos do ECG ao longo do tratamento crônico em animais não-contidos, garantindo um bom nível estabilidade do sinal e excelente relação sinal-ruído para os sinais eletrocardiográficos. A Figura 12 apresenta, para um animal CONTROLE e um animal DECA, segmentos de traçados de ECG não-filtrados, adquiridos na oitava semana de tratamento, juntamente com os respectivos tacogramas obtidos para todo o sinal (20 minutos de duração), após filtragem, subtração de linha de base (descrita na seção 3.5.1) e detecção dos picos das ondas R.

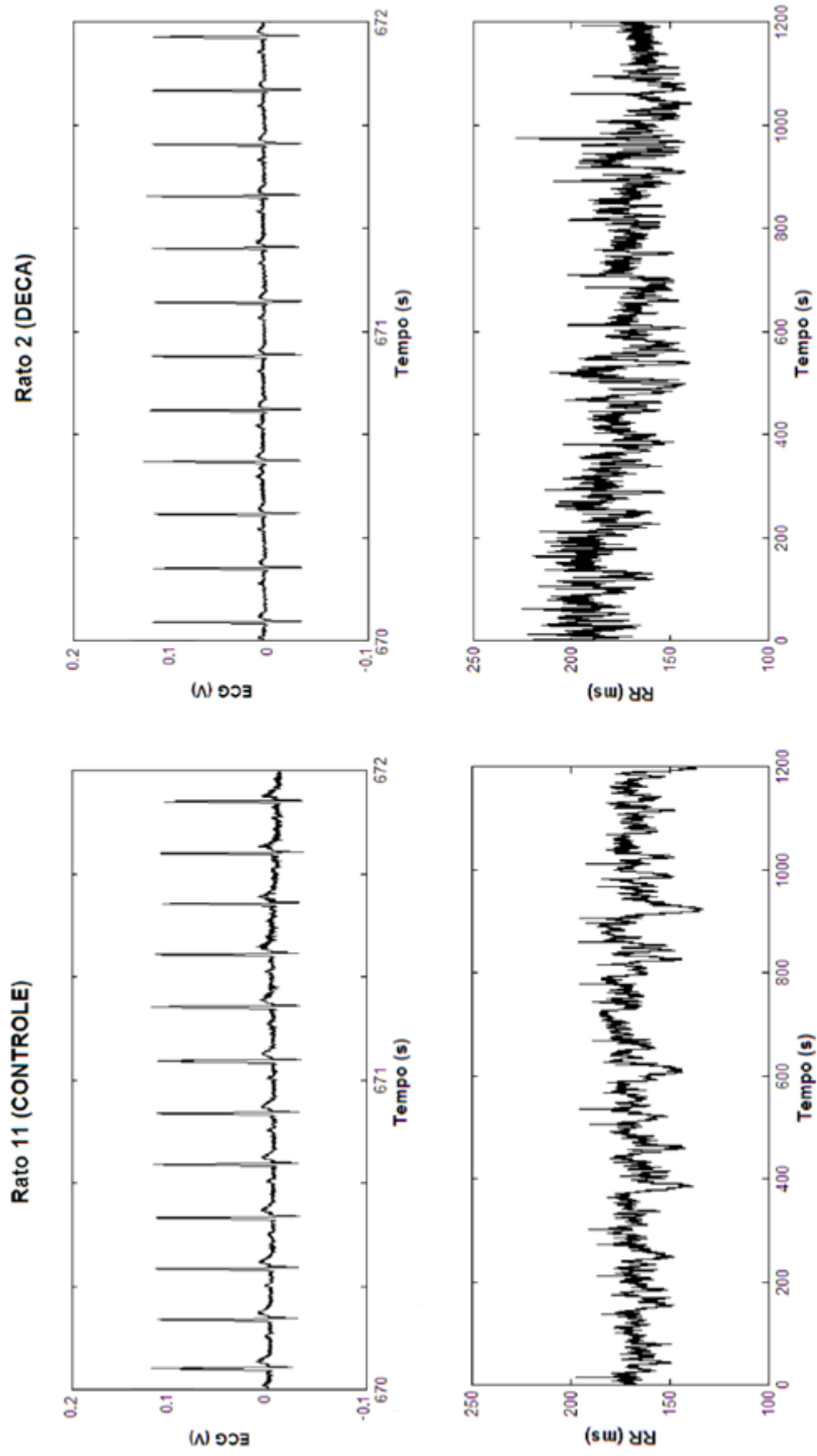


Figura 12. Traçados de ECG (acima) e tacogramas (abaixo), obtidos na Semana 8 do protocolo experimental, referentes a um animal CONTROLE (esquerda) e a um animal DECA (direita).

4.3.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca - Métodos Lineares

Os resultados das análises de VFC no domínio do tempo, registrados ao longo de 8 semanas, estão sumarizados na figura 13. Conforme pode ser observado, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para RR (intervalo RR médio), SDNN (desvio padrão dos intervalos RR), ou para a raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR sucessivos (RMSSD), índice de controle parassimpático no domínio do tempo.

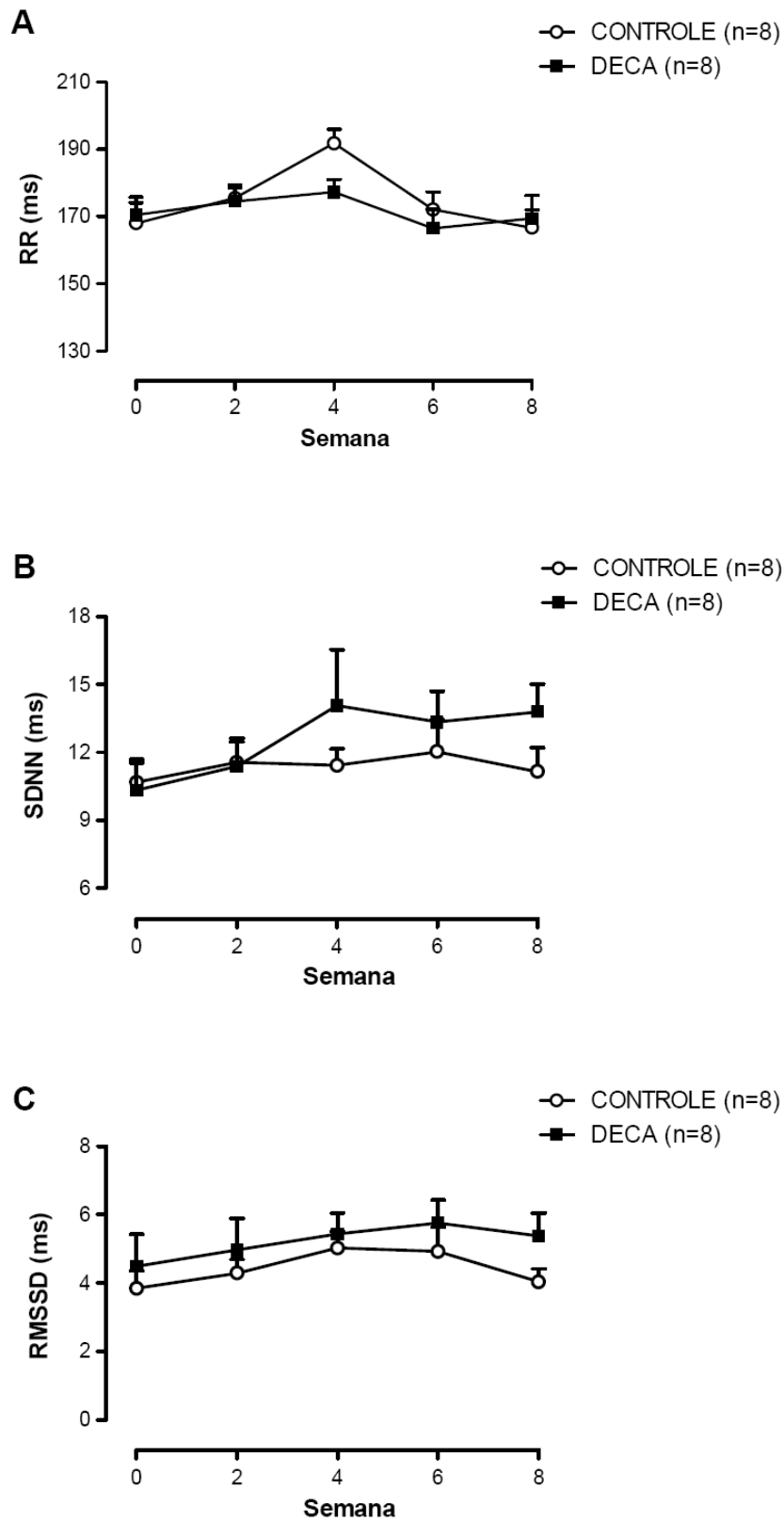


Figura 13. Evolução dos índices de VFC no domínio do tempo obtidos ao longo de 8 semanas. A semana zero representa os valores basais registrados previamente ao início do tratamento com DECA ou veículo. A - Intervalo RR médio; B - Desvio padrão dos intervalos RR; C - Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR sucessivos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

A figura 14 ilustra a evolução dos perfis espectrais médios da frequência cardíaca nas semanas estudadas. Através da simples observação visual dos espectros médios, a análise de VFC no domínio da frequência já indica claramente o aumento na densidade de potência espectral na banda de baixa frequência (BF) no grupo DECA, comparado ao CONTROLE, nas últimas semanas estudadas. Conforme pode ser visto na Figura 15 (A), a análise estatística dos valores de potência em BF demonstra que, nas semanas 6 e 8, este índice apresentou-se significativamente aumentado no grupo DECA, em relação ao CONTROLE. Em consonância com este achado, os resultados ilustrados em 15 (C) revelam que a razão entre as potências espectrais em BF e AF foi significativamente maior em DECA em relação ao CONTROLE. Somados, tais resultados comprovam que, a partir da sexta semana, o tratamento com DECA foi capaz de resultar no aumento da modulação simpática cardíaca, com desvio do balanço simpato-vagal em direção ao predomínio deste primeiro ramo. Analisado isoladamente, o componente espectral relacionado ao controle parassimpático [potência em alta frequência (AF)] não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhuma das semanas estudadas (Figura 15 B).

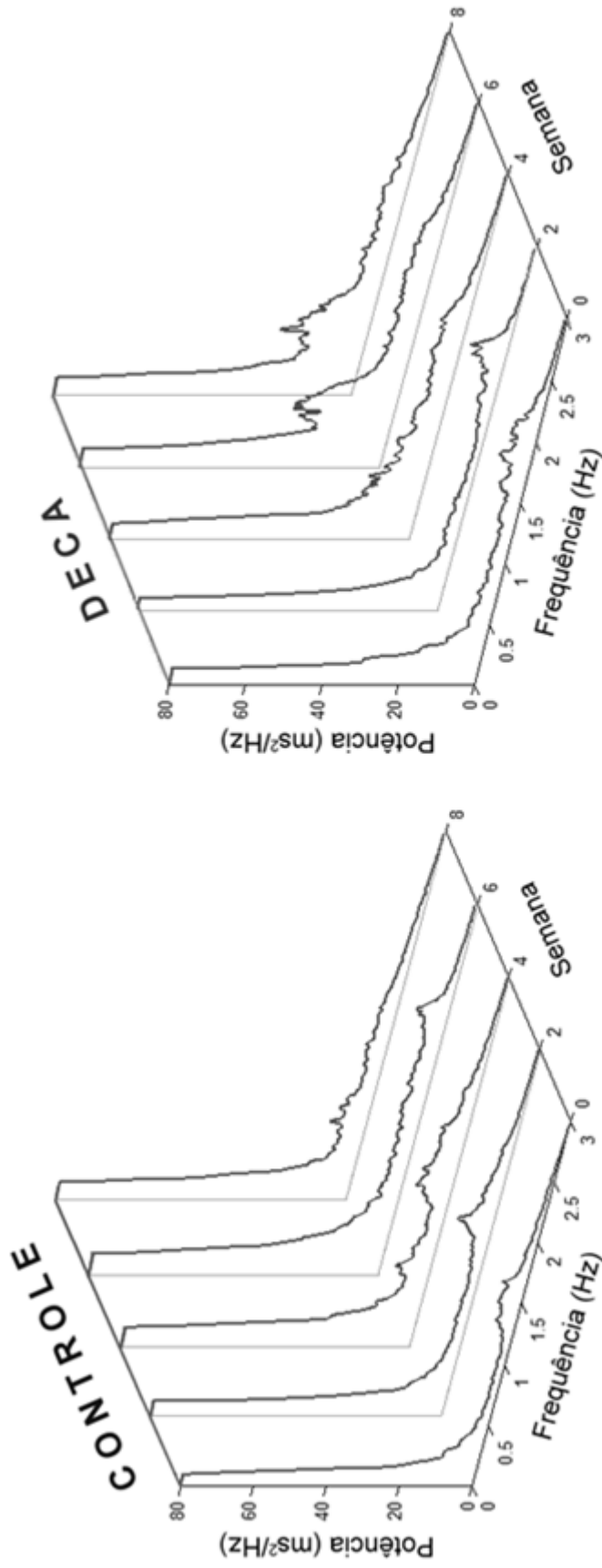


Figura 14. Evolução dos perfis espectrais da frequência cardíaca. Na figura estão representados espectros médios para as semanas estudadas, os quais foram obtidos a partir da promediação dos sinais no domínio da frequência referentes a cada um dos 8 animais que compuseram cada grupo experimental (CONTROL: n=8; DECA: n=8).

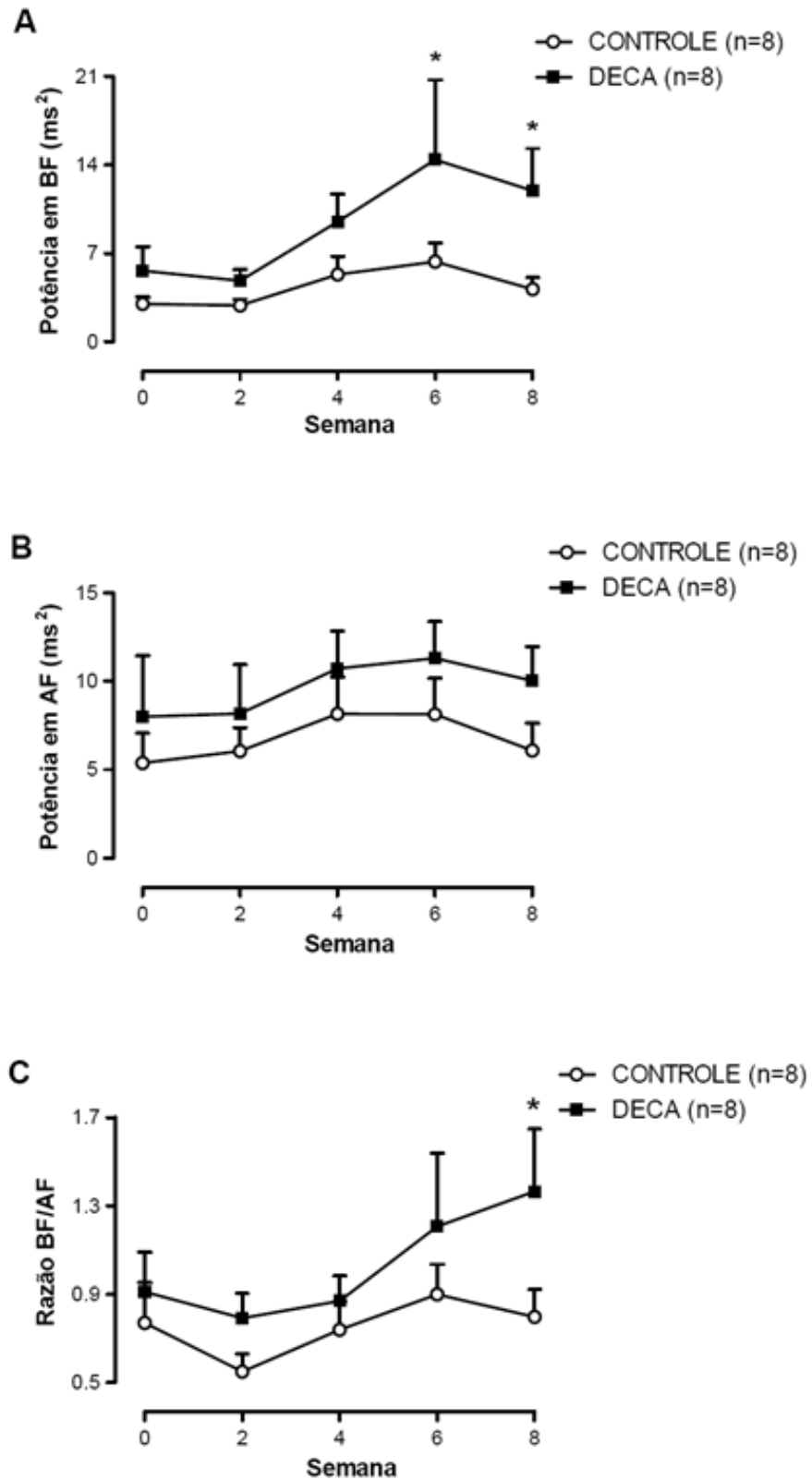


Figura 15. Evolução dos índices de VFC no domínio da frequência obtidos ao longo de 8 semanas. A semana zero representa os valores basais registrados previamente ao início do tratamento com DECA ou veículo. A - Potência espectral em BF; B - Potência espectral em AF; C - Razão BF/AF. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ DECA versus CONTROLE.

4.3.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca - Métodos não-lineares

A Figura 16 ilustra exemplos dos gráficos obtidos a partir da análise de flutuação sem tendência (DFA). Conforme pode ser observado, estão ilustradas plotagens de $\log_{10}F(n)$ por $\log_{10}n$ para um animal CONTROLE e um animal DECA, referentes à semana 8 do protocolo experimental. O tratamento com DECA não resultou em alterações nas propriedades fractais da dinâmica da frequência cardíaca. Conforme mostra a Figura 17, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os expoentes escalares de curto ou longo prazo (α_1 e α_2 , respectivamente).

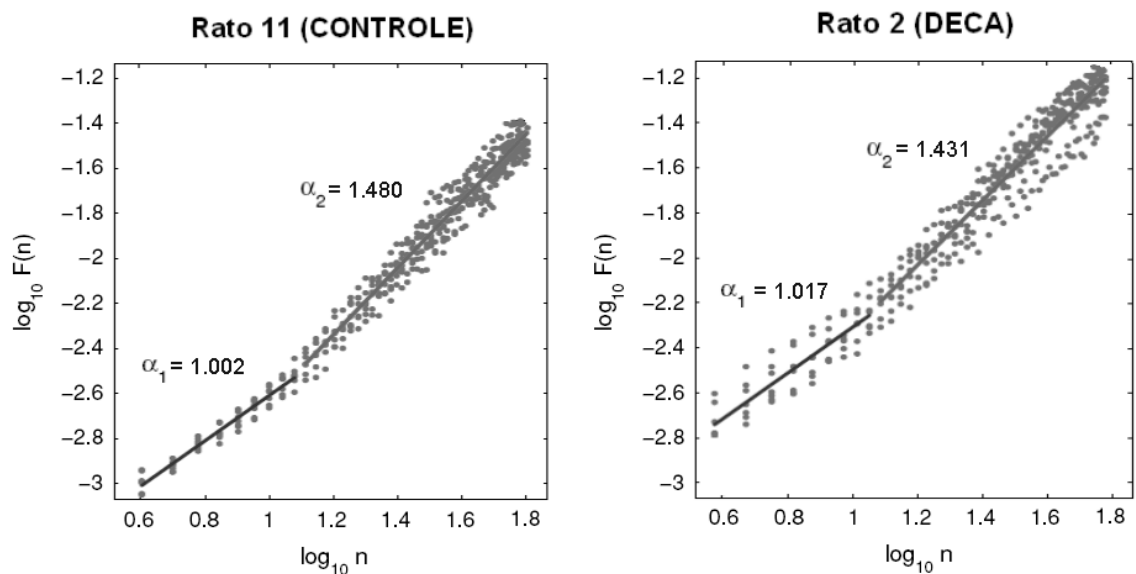


Figura 16. Análise de flutuação sem tendência (DFA) conduzida em 7000 intervalos RR, adquiridos na semana 8 do protocolo experimental, em um animal CONTROLE e um animal DECA. A figura ilustra as plotagens $\log_{10}F(n)$ por $\log_{10}n$, juntamente com os valores de α_1 e α_2 obtidos para cada animal.

O tratamento crônico com o esteróide anabólico também não foi capaz de produzir alterações nos níveis de complexidade da FC. Conforme pode ser visto na Figura 17 C, em nenhuma das semanas estudadas registrou-se diferenças entre os grupos para os valores de ApEn.

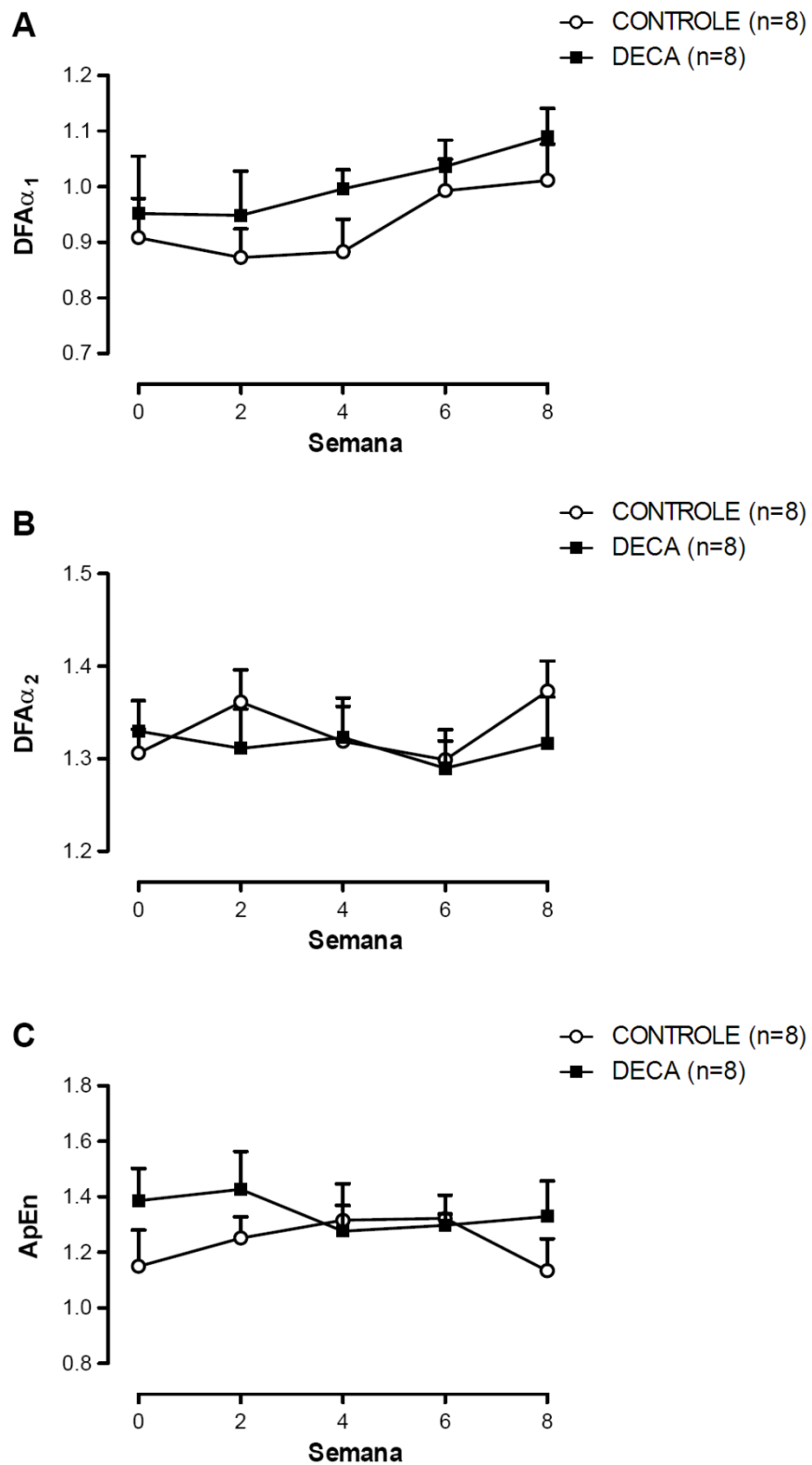


Figura 17. Evolução dos índices não-lineares de VFC no obtidos ao longo de 8 semanas. A semana zero representa os valores basais registrados previamente ao início do tratamento com DECA ou veículo. A – Expoente escalar de curto prazo; B – Expoente escalar de longo prazo; C – Entropia aproximada. Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

4.3.3 Variabilidade da Pressão Arterial (VPA)

Os valores de pressão arterial sistólica média não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (CONTROLE $124,6 \pm 1,9$ vs. DECA $119,6 \pm 4,0$ mmHg). No domínio do tempo, a variabilidade da pressão arterial total (desvio padrão da PAS) também não foi diferente entre os grupos (CONTROLE $3,70 \pm 0,50$ vs. DECA $3,99 \pm 0,79$ mmHg). Da mesma forma, o tratamento com o esteroide anabólico não foi capaz de produzir alterações significativas nos índices de VPA no domínio da frequência (Potência em BF: CONTROLE $4,65 \pm 1,23$ vs. DECA $4,48 \pm 2,17$ mmHg²; Potência em AF: CONTROLE $1,59 \pm 0,37$ vs. DECA $1,63 \pm 0,54$ mmHg²).

4.3.4 Sensibilidade Barorreflexa

Conforme descrito na sub-seção 3.5.5, no presente trabalho, a atividade barorreflexa foi estudada através da aplicação de metodologias de análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo.

A Figura 18 ilustra, para um animal CONTROLE e um animal DECA representativos, as respectivas plotagens de sequências crescentes [incremento concomitante entre os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), mostradas acima] e decrescentes (decréscimo concomitante de PAS e IP, mostradas abaixo). Em cada uma das quatro plotagens observam-se, além de todas sequências de 3 batimentos identificadas pelo algoritmo, juntamente com suas respectivas linhas de ajuste, uma reta de maior espessura e comprimento, representando a média de todos os coeficientes angulares calculados (ms/mmHg).

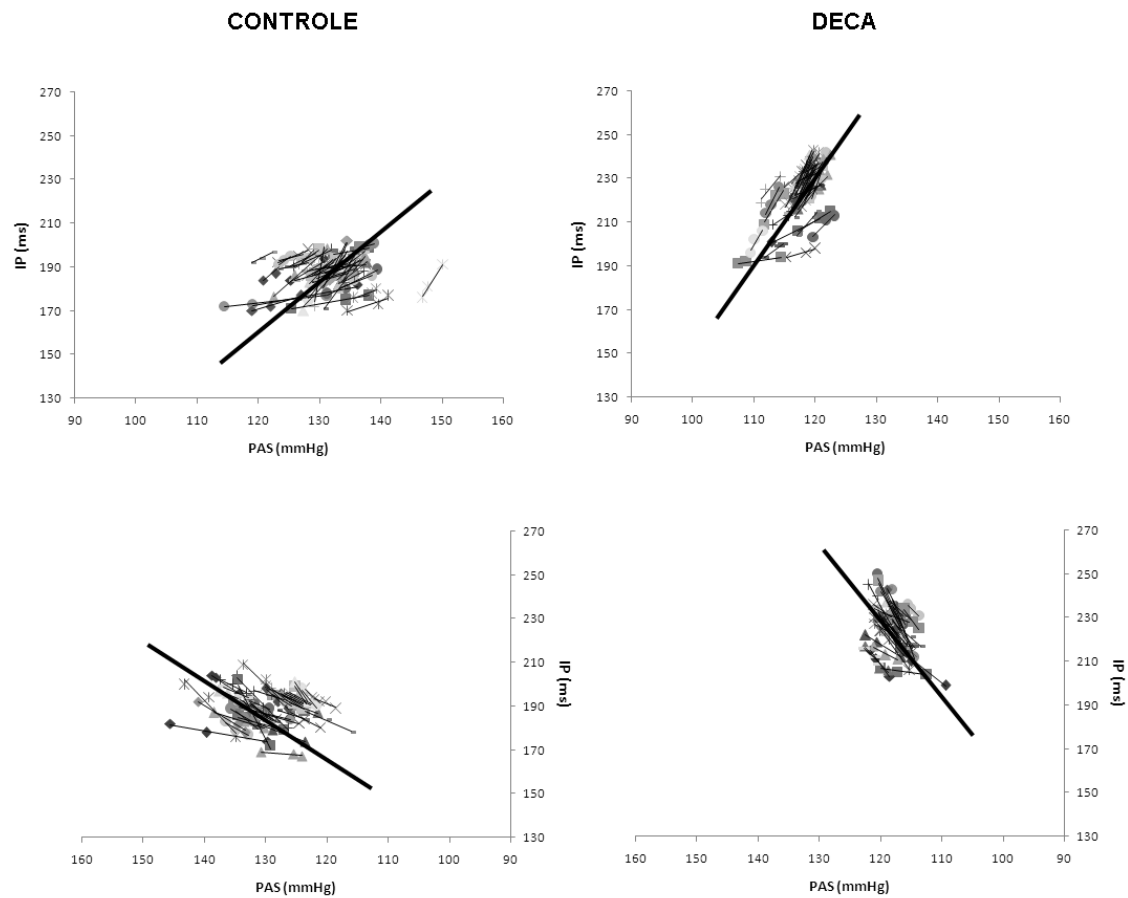


Figura 18. Plotagens de seqüências crescentes (+IP/+PAS, acima) e decrescentes (-IP/-PAS, abaixo) para um animal CONTROLE e um animal DECA representativos. Em cada uma das quatro plotagens, a reta de maior espessura e comprimento representa a média de todos os coeficientes angulares calculados (ms/mmHg).

Conforme ilustra a Figura 19, tanto a análise de seqüências crescentes quanto a análise de seqüências decrescentes revelaram o aumento significativo da sensibilidade barorreflexa no grupo DECA ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

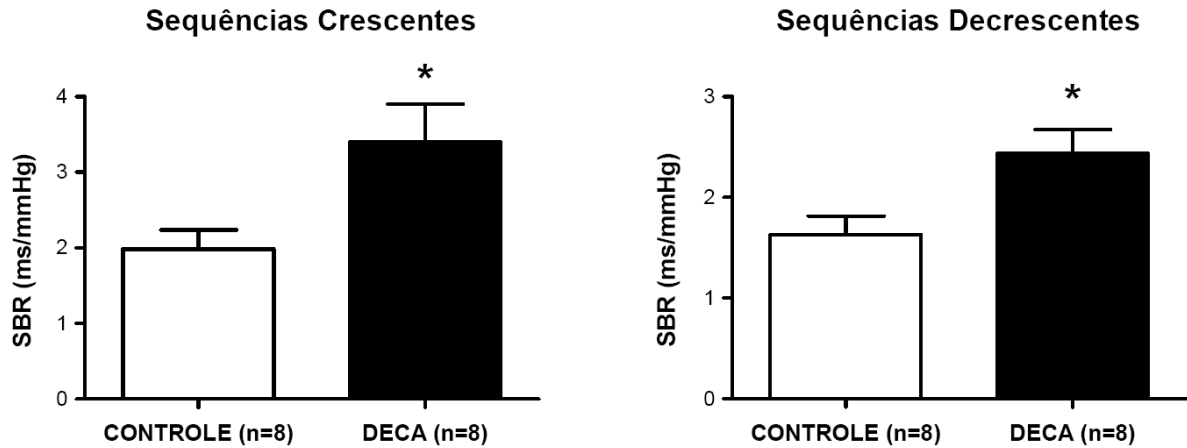


Figura 19. Comparação da sensibilidade barorreflexa (SBR) entre os grupos, obtida pelo método de sequências, ao final do protocolo experimental. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus CONTROLE.

Conforme descrito na sub-seção 3.5.5, para o estudo da sensibilidade barorreflexa por análise espectral, foram considerados somente os animais os quais apresentaram valores de coerência superiores a 0,4 ao longo do comprimento das bandas de baixa e alta frequência, o que é indicativo de acoplamento satisfatório entre os sinais IP e PAS. Em função disto, dois animais foram excluídos da análise, ambos pertencentes ao grupo DECA. A Figura 20 ilustra, para um animal CONTROLE e um animal DECA, as séries de intervalos de pulso (A, B) e de pressão arterial sistólica (C, D), batimento a batimento, os espectros de IP (E, F) e PAS (G, H), e os níveis de coerência entre os sinais de IP e PAS (I, J) na faixa de 0 a 3 Hz. Na comparação entre os grupos, a análise estatística do índice alfa demonstrou maior sensibilidade barorreflexa nos animais tratados com DECA, tanto para a banda de baixa frequência quanto para a banda de alta frequência ($p < 0,05$ para ambas as comparações), conforme mostra a Figura 21.

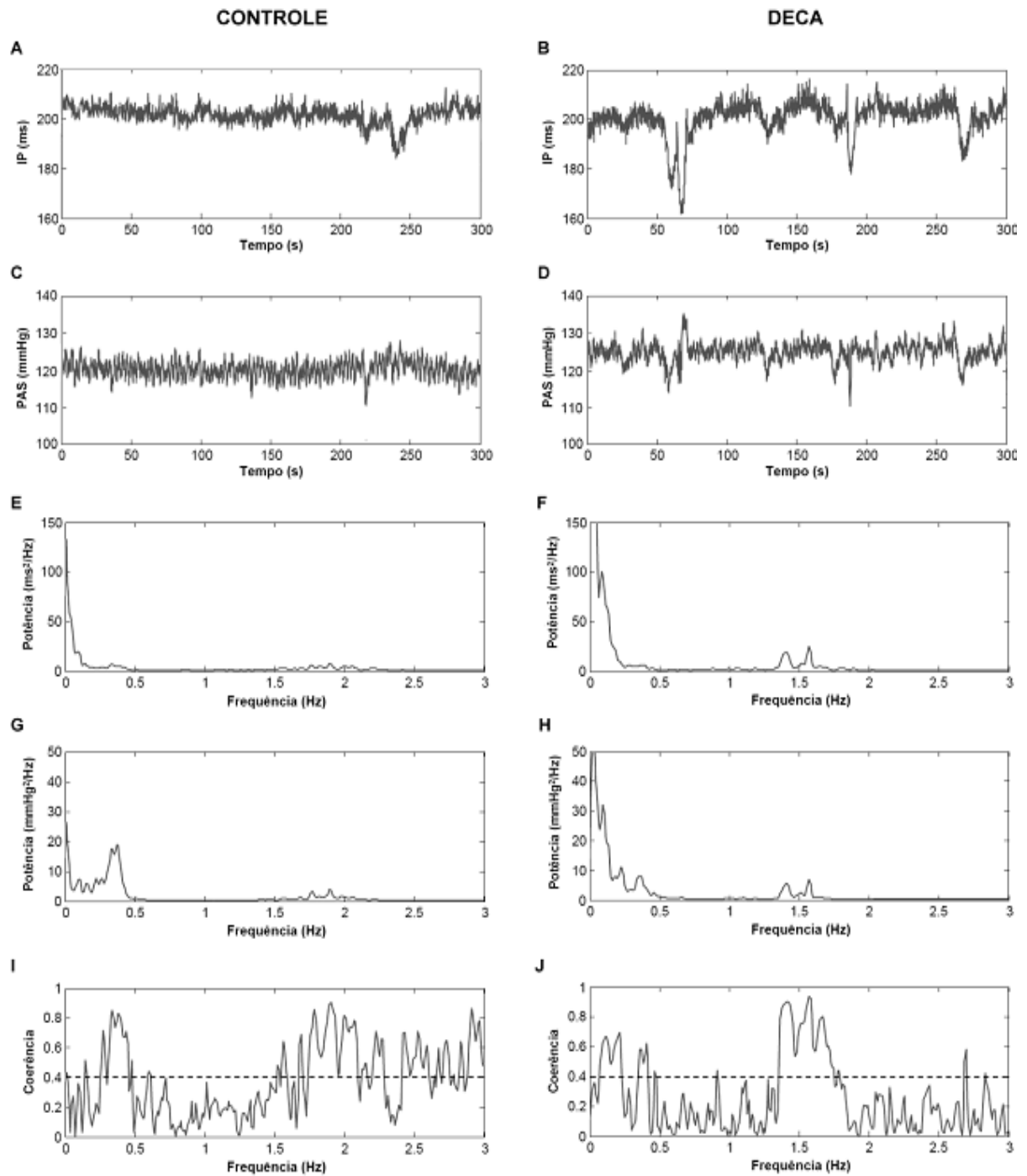


Figura 20. Séries de intervalos de pulso (A, B) e de pressão arterial sistólica (C, D) batimento a batimento, espectros de IP (E, F) e PAS (G, H), e coerência entre os sinais de IP e PAS (I, J), em um animal CONTROLE e um animal DECA.

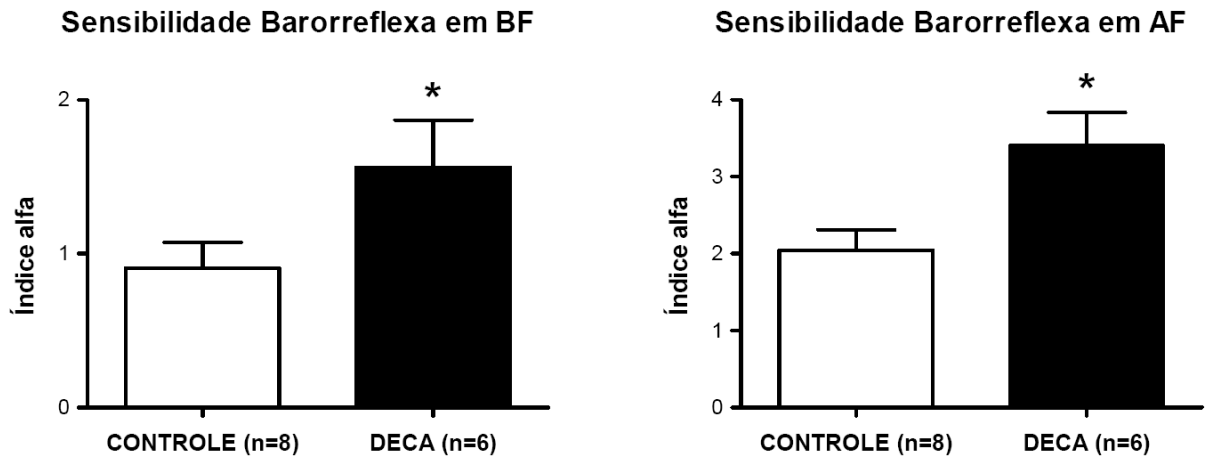


Figura 21. Comparação da sensibilidade barorreflexa entre os grupos, calculada pelo método da análise espectral (índice alfa), ao final do protocolo experimental. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus CONTROLE.

4.4 Função Cardíaca *ex vivo*

A Tabela 4 resume os resultados dos experimentos realizados em corações isolados. Na condição basal, não foram encontradas diferenças entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados. Para a mais alta concentração de isoproterenol (ISO) perfundida (10^{-6} M), os corações do grupo DECA apresentaram frequência cardíaca (FC) significativamente aumentada em relação ao grupo CONTROLE ($p < 0,05$), o que caracteriza um padrão de resposta cronotrópica exagerada à estimulação beta-adrenérgica nos corações dos animais tratados com o esteroide anabólico. Para esta mesma concentração de ISO, os corações do grupo DECA apresentaram menores valores de LVEDP (pressão do ventrículo esquerdo ao fim da diástole), comparados ao grupo CONTROLE ($p < 0,05$).

Tabela 4. Efeitos do tratamento com DECA sobre a função cardíaca *ex vivo*.

| | Basal | | | ISO 10 ⁻⁸ M | | | ISO 10 ⁻⁷ M | | | ISO 10 ⁻⁶ M | | |
|---------------|---------------|--------------|---------------|------------------------|---------------|---------------|------------------------|---------------|----------|------------------------|----------|------|
| | CONTROLE | DECA | CONTROLE | DECA | CONTROLE | DECA | CONTROLE | DECA | CONTROLE | DECA | CONTROLE | DECA |
| FC | 257,9±6,0 | 275,0±12,89 | 266,7±6,7 | 287,1±11,9 | 296,4±8,9 | 315,0±7,2 | 314,3±14,1 | 343,2±5,9* | | | | |
| LVSP | 86,5±5,9 | 76,0±4,1 | 117,4±9,0 | 107,5±10,4 | 176,3±8,8 | 156,4±12,7 | 189,3±13,0 | 163,8±16,7 | | | | |
| LVEDP | 13,0±0,3 | 12,8±0,4 | 12,7±0,2 | 12,6±0,4 | 12,6±0,7 | 12,1±0,6 | 16,7±4,1 | 12,0±0,6* | | | | |
| LVDP | 73,5±6,0 | 63,3±4,2 | 104,7±9,0 | 94,9±10,4 | 163,7±8,9 | 144,3±12,6 | 172,6±14,1 | 151,8±16,4 | | | | |
| +dP/dt | 2247,9±175,6 | 2011,3±91,6 | 3228,7±278,0 | 3090,5±264,5 | 5964,2±646,9 | 5644,7±655,8 | 7786,3±1112,0 | 6933,7±1016,2 | | | | |
| -dP/dt | -1405,1±131,0 | -1191,5±65,4 | -2221,5±235,4 | -2027,9±254,4 | -3847,4±256,6 | -3562,1±338,8 | -4319,3±388,9 | -4275,2±465,0 | | | | |

Frequência cardíaca (FC, bpm), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP, mmHg), pressão do ventrículo esquerdo ao fim da diástole (LVEDP, mmHg), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP, mmHg), pico da primeira derivada positiva de pressão no ventrículo esquerdo (+dP/dt, mmHg/s) e pico da primeira derivada negativa de pressão no ventrículo esquerdo (-dP/dt, mmHg/s). Valores expressos em média ± erro padrão da média, referentes às condições basais e de estimulação adrenérgica com isoproterenol (ISO). *p<0,05 versus CONTROLE.

4.5 Comportamento Ingestivo

4.5.1 Ingestão de Água e Sal

A Figura 22 ilustra os resultados referentes à ingestão basal de água e solução salina (NaCl a 1,8%) no período de 24 h. Conforme pode ser observado, em comparação ao grupo CONTROLE, o grupo DECA apresentou maior ingestão de água e menor ingestão de salina ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

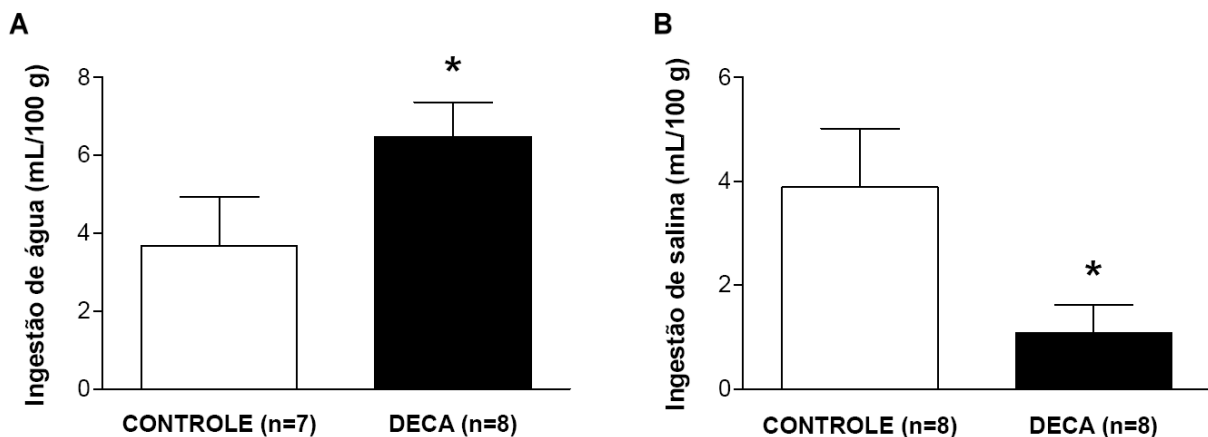


Figura 22. Comparação entre os grupos para os níveis basais de ingestão de água e solução de NaCl a 1,8%, na semana 9 do protocolo experimental. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus CONTROLE.

Similarmente, após o desafio de 24 horas em privação hídrica, os animais DECA apresentaram maiores níveis de ingestão de água em todas os intervalos analisados, conforme ilustra a Figura 23 A. A ingestão de salina não diferiu entre os grupos no período de 60 a 300 min pós-privação, sendo, no entanto, significativamente maior no grupo DECA em 600 minutos ($p < 0,01$ na comparação com o grupo CONTROLE), como pode ser observado em B.

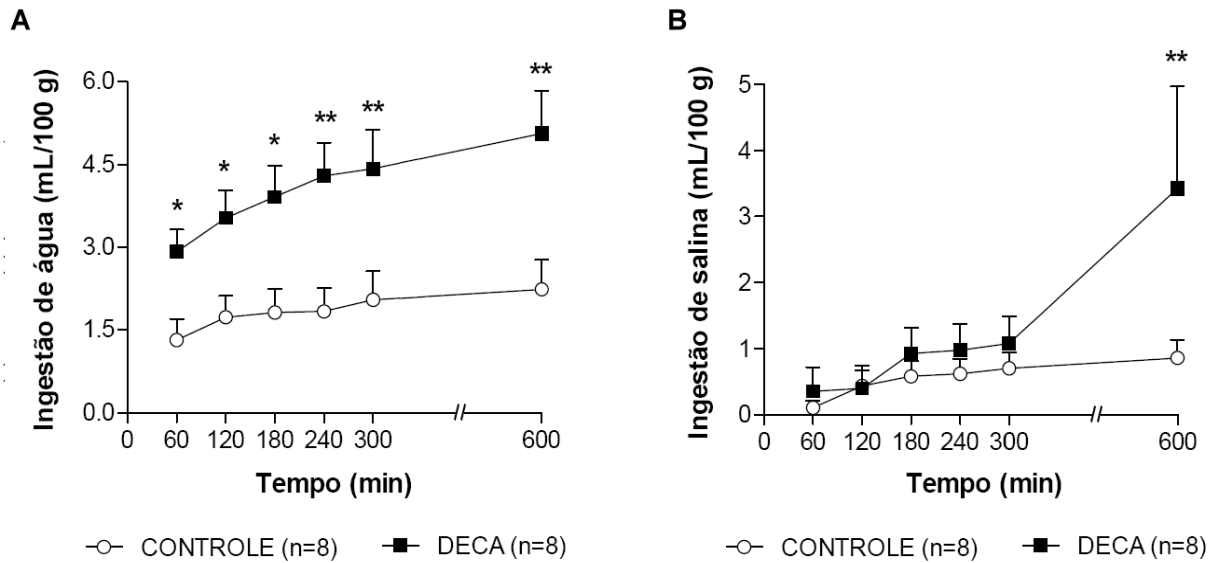


Figura 23. Comparações seriadas entre os grupos para os níveis de ingestão de água e salina após 24 h de privação hídrica. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus CONTROLE.

4.5.2 Ingestão de Ração

Conforme descrito na sub-seção 3.7.2, a medida da ingestão alimentar foi realizada na semana 11 do protocolo experimental. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a ingestão de ração em 24 h, seja em valores absolutos (CONTROLE $24,38 \pm 1,12$ vs. DECA $23,00 \pm 0,86$ g) ou relativos (CONTROLE $5,02 \pm 0,14$ vs. DECA $5,40 \pm 0,17$ g/100 g de peso corporal).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, os animais tratados com DECA apresentaram menor ganho de peso corporal ao longo das semanas, em comparação ao grupo CONTROLE. A dose de DECA adotada na presente tese é típica em trabalhos voltados ao estudo do impacto cardiovascular desta droga em ratos, sendo equivalente às doses aplicadas por humanos os quais fazem abuso de esteroide anabólico (EA) (TRIFUNOVIC *et al.*, 1995; NORTON *et al.*, 2000). Apesar de aparentemente paradoxal, o menor ganho de peso é tipicamente observado em ratos tratados cronicamente com altas doses de DECA (TRIFUNOVIC *et al.*, 1995; JOUMAA & LEÓTY, 2001; LINDBLOM *et al.*, 2003; BISSOLI *et al.*, 2009). Em seu estudo, Lindblom *et al.* (2003) observaram redução na ingestão alimentar e na massa de gordura abdominal nos animais tratados com EA, postulando que tais alterações poderiam ser mediadas por anormalidades no sistema de melanocortinas, tendo em vista o fato de que evidenciaram o aumento nos níveis de alfa-MSH nestes animais. A ausência de diferenças entre os grupos CONTROLE e DECA para a ingestão de ração, descrita no presente trabalho, vai de encontro aos achados de Lindblom *et al.*, e corrobora os resultados de Trifunovic *et al.* (1995), os quais não observaram qualquer efeito do tratamento com DECA sobre a ingestão de alimento ou sobre os níveis de absorção intestinal de energia. Desta forma, deve-se considerar um possível efeito lipolítico do EA, resultando no menor ganho de peso corporal no grupo tratado com DECA (DE PERGOLA, 2000). Nesse sentido, estudos prévios, conduzidos em ratos e humanos, demonstraram redução nos níveis de massa gorda corporal após o tratamento com decanoato de nandrolona (HASSAGER *et al.*, 1989; CARSON *et al.*, 2002).

A perspectiva de desenvolvimento de um trabalho baseado no estudo do controle dinâmico cardiovascular, utilizando o rato como modelo animal, inicialmente esbarrou em um entrave de ordem metodológica: o Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho não dispunha de metodologias para a aquisição do eletrocardiograma (ECG) em animais não-anestesiados, fato este o qual inviabilizava a implementação da análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) nos projetos que, àquele momento, vinham sendo delineados e desenvolvidos. É sabido que o rato constitui um importante modelo animal para o estudo da VFC, sendo viável para aplicação em abordagens fisiopatológicas, toxicológicas, e em trabalhos voltados à investigação dos efeitos de exposição a agentes ambientais (KRÜGER *et al.*, 2000; SANYAL *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2007; ROWAN III *et al.*, 2007). Os sistemas baseados em telemetria, apesar de robustos para a aquisição do ECG em ratos não-anestesiados (HOWARTH *et al.*, 2008), apresentam elevados custos, o que torna sua aplicação inviável em considerável parcela dos laboratórios de fisiologia cardiovascular, essencialmente, aqueles situados nos países em desenvolvimento. Nesse sentido, além de ter dado viabilidade à realização de experimentos fundamentais para a presente tese, o trabalho de desenvolvimento e implementação de metodologias de baixo custo para a aquisição do ECG em ratos não-anestesiados, o qual foi conduzido ao longo destes anos, permanece como legado, não somente para a comunidade interna, mas também externa ao laboratório, levando-se em conta o fato de que a descrição de uma das abordagens metodológicas resultou em artigo científico aceito para publicação (Apêndice B).

Acompanhando as metodologias para a aquisição de sinais, vieram sendo implementadas pelo autor ferramentas computacionais para o estudo da

variabilidade cardiovascular e barorreflexo espontâneo em murinos. Mais recentemente, a partir da necessidade de se trabalhar com registros de maior duração, em virtude dos requisitos metodológicos para o estudo da VFC não-linear (BECKERS *et al.*, 2006), foi também testado e implementado, com sucesso, um filtro não-linear baseado na subtração da linha de base do ECG, tomando-se como base o método descrito por Keselbrener *et al.* (1997). A implementação deste filtro viabilizou a utilização, em trechos longos, do detector de picos de ondas R baseado em limiar. Os algoritmos gerados para a análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em ratos e camundongos, atualmente, têm sido utilizados rotineiramente por alunos inseridos em diferentes projetos do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho e do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular.

O valor prognóstico da VFC é documentado de maneira consistente em humanos (TSUJI *et al.*, 1996), e, além disso, tem sido também apontado em roedores (ROWAN III *et al.*, 2007). Distúrbios no controle autonômico cardíaco, associados à arritmogênese e morte súbita cardíaca, por exemplo, em pacientes pós-infarto do miocárdio e portadores de diabetes mellitus, além de detectáveis sob a forma de alterações na VFC em humanos, são também reproduzidos em ratos (KRÜGER *et al.*, 2000; SANYAL *et al.*, 2002), o que ratifica a validade da utilização deste modelo.

O trabalho publicado em 2006, contendo os principais resultados anteriormente apresentados na dissertação de mestrado do autor, foi o primeiro a demonstrar que o tratamento crônico com altas doses de esteroide anabólico resulta em disfunção na regulação autonômica cardíaca, trazendo à tona um consistente

mecanismo através do qual o abuso de EA pode se associar ao aumento no risco cardiovascular, com maior suscetibilidade à ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2006). Neste primeiro momento, o grupo tratado com o DECA apresentou significativo quadro de disfunção parassimpática cardíaca, tendo sido registradas, durante a oitava semana de tratamento, marcantes reduções na potência espectral em AF e nos índices temporais RMSSD e pNN5. Além disso, os resultados apontaram uma tendência de aumento da razão BF/AF no grupo DECA.

No presente trabalho, apesar de, isoladamente, não terem sido replicados os resultados prévios de redução nos índices de controle parassimpático da VFC, foi demonstrado que o tratamento com DECA resultou no aumento da modulação simpática cardíaca, com desvio do balanço simpato-vagal em direção ao predomínio do ramo simpático. Nesse sentido, a potência espectral em BF foi significativamente maior no grupo DECA, comparado ao CONTROLE, a partir da sexta semana de tratamento, enquanto que o aumento da razão BF/AF no grupo DECA foi registrado na oitava semana. É possível que os avanços metodológicos alcançados ao longo do desenvolvimento da presente tese, os quais viabilizaram o estudo da VFC em séries temporais de maior duração (como, por exemplo, a implementação do filtro por subtração de linha de base), tenham conferido à análise uma maior sensibilidade às flutuações de baixa frequência, permitindo assim que fosse observada no grupo DECA, com significância estatística, uma maior razão BF/AF (juntamente com o aumento na potência espectral em BF), resultado este o qual fora previamente sugerido apenas como uma tendência (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2006). No que concerne à ausência de diferenças entre os grupos, na presente tese, para os índices parassimpáticos da VFC, em contraste à menor modulação parassimpática

anteriormente observada nos animais DECA (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2006), pode-se postular um possível papel do horário de aquisição dos sinais de ECG. Nesse sentido, deve-se destacar que, na presente tese, todos os registros foram realizados no período de 0600-0900h. Em PEREIRA-JUNIOR *et al.* (2006), as aquisições de sinais foram feitas entre 1300-1500h, período este situado na região central da fase clara do ciclo claro/escuro, na qual, em ratos, tipicamente são registrados menores níveis de atividade locomotora e maior modulação parassimpática da VFC (ZHANG & SANNAJUST, 2000; WAKI *et al.*, 2006).

O perfil de aumento na modulação simpática, com desvio do balanço simpato-vagal em direção ao predomínio do ramo simpático, conforme encontrado, no presente trabalho, no grupo de animais tratados com DECA, é tipicamente descrito em diferentes condições patológicas, tais como no infarto do miocárdio, hipertensão essencial, nos transtornos de estresse, entre outros (LOMBARDI *et al.*, 1987; GUZZETTI *et al.*, 1988; COHEN *et al.*, 2000). Sabe-se que a ativação simpática apresenta, no coração, efeito arritmogênico, pois reduz o período refratário efetivo ventricular, assim como o limiar de fibrilação ventricular (KOLMAN *et al.*, 1975; MARTINS & ZIPES, 1980). Em geral, os níveis de atividade tônica de cada um dos ramos do sistema nervoso autônomo sobre o coração são modulados de maneira antagônica, o que, no entanto, não exclui a existência de outras formas mais complexas de interação simpato-vagal (LEVY, 1971). Sendo assim, a análise do balanço autonômico é de fundamental importância, pois desvios no sentido do predomínio simpático são associados à ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca (VANOLI *et al.*, 1991; ESLER, 1992). Nesse sentido, utilizando a análise espectral da VFC, Lombardi *et al.* (2000) evidenciaram que aumentos em BF/AF precediam a ocorrência de taquicardias ventriculares, sendo os sinais de

ativação simpática detectáveis em todos os pacientes estudados (LOMBARDI *et al.*, 2000).

Com base na discussão apresentada no parágrafo anterior, pode-se postular que o aumento na modulação simpática cardíaca, e o respectivo desvio no balanço autonômico, encontrados no presente trabalho, fortemente corroborem a hipótese de envolvimento de distúrbios de regulação autonômica sobre a arritmogênese e mortalidade cardíaca em usuários de EA. Em consonância com estes achados, Bissoli *et al.* (2009), utilizando protocolo de tratamento com DECA, em ratos, idêntico ao descrito na presente tese, recentemente mostraram a ocorrência de anormalidades no controle reflexo cardiopulmonar após oito semanas, tendo este mesmo grupo, entretanto, previamente falhado em apresentar tal tipo de alteração com apenas quatro semanas de tratamento (ANDRADE *et al.*, 2008). O acompanhamento do curso temporal da VFC, realizado na segunda etapa, o qual demonstrou a ocorrência de alterações no controle autonômico cardíaco com apenas seis semanas de tratamento, reforça a hipótese de que a disfunção autonômica possa constituir uma manifestação precoce da fisiopatologia cardiovascular do abuso de EA. Nesse sentido, os resultados falharam em apontar, em condições basais, a ocorrência de alterações na função cardíaca sistólica ou diastólica após onze semanas de tratamento com DECA. Em concordância com estes resultados, em animais sedentários, Liang *et al.* (1993) não evidenciaram qualquer efeito do tratamento com DECA sobre a função cardíaca. Em condições basais, Norton *et al.* (2000) também não observaram qualquer efeito do tratamento com DECA sobre a contratilidade de corações de ratos, tendo, no entanto, evidenciado anormalidades na função diastólica no grupo tratado com o EA, efeito este o qual pode ter sido dependente do maior período de tratamento adotado por

estes autores. Em contrapartida, LeGros e colaboradores (2000) descreveram menor função contrátil e menor complacência cardíaca em ratos tratados com EA, entretanto, este grupo utilizou um EA distinto (17 α -metiltestosterona), adotando doses semanais aproximadamente equivalentes ao triplo daquela aplicada na presente tese.

Em um estudo recentemente publicado, Fanton e colaboradores (2009) descreveram os resultados de uma análise retrospectiva de morte súbita cardíaca, a qual se deu a partir do estudo de 15000 exames *post mortem*, realizados ao longo de vinte e quatro anos, juntamente com aqueles obtidos em experimentos conduzidos em um modelo animal de abuso de EA. Neste trabalho, tanto as análises histopatológicas conduzidas nos corações de humanos, assim como de coelhos, apontaram a ocorrência de lesões cardíacas análogas àquelas tipicamente observadas na miocardite adrenérgica. Este achado, se interpretado conjuntamente aos resultados da presente tese, permite que seja levantada a hipótese de que o estabelecimento precoce da disfunção autonômica possa contribuir para o posterior aparecimento das alterações estruturais cardíacas, as quais são tipicamente observadas nos relatos de casos de abuso de EA. Desta forma, pode-se postular que, ao longo do curso temporal de sua fisiopatologia cardiovascular, efeitos indiretos dos EA, possivelmente desencadeados pela maior atividade simpática sustentada sobre o coração, somem-se aos seus efeitos diretos sobre este órgão, resultando nas alterações da arquitetura miocárdica tipicamente associadas à instabilidade elétrica, arritmogênese e morte súbita cardíaca em indivíduos com histórico de abuso prolongado de EA (LUKE *et al.*, 1990; KENNEDY & LAWRENCE, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1998; THIBLIN *et al.*, 1999).

É possível que a maior modulação simpática da atividade cardíaca, registrada no grupo DECA, tenha origem em mecanismos centrais. Nesse sentido, estudos prévios mostraram que o tratamento com este EA é capaz de influenciar o funcionamento de diferentes sistemas de neurotransmissão no sistema nervoso central (SCHLUSSMAN *et al.*, 2000; TAMAKI *et al.*, 2003; CARRILLO *et al.*, 2009). Deve-se destacar o trabalho de Tamaki *et al.* (2003), os quais descreveram, em ratos tratados com nandrolona, o aumento nos níveis de noradrenalina, e de seu metabólito 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol, no hipotálamo, um centro de papel fundamental para a gênese e manutenção do tônus simpático cardíaco. Dentro desta perspectiva, fora previamente demonstrado que o aumento no *turnover* de noradrenalina no hipotálamo associa-se ao estabelecimento de um estado hiperadrenérgico sistêmico (DE WARDENER, 2001), sendo o núcleo paraventricular (PVN) o principal núcleo de onde partem os neurônios pré-motores simpáticos hipotalâmicos (GUYENET, 2006). Bao *et al.* (2006) demonstraram a existência de receptores androgênicos no PVN, tendo este grupo sugerido um possível papel estimulador do nível de andrógenos circulantes sobre a expressão de neurônios contendo CRH (hormônio de liberação da corticotropina) neste núcleo (BAO & SWAAB, 2007), achado este que, se interpretado à luz de observações recentemente publicadas por Yamada *et al.* (2009), os quais evidenciaram um papel do CRH produzido no PVN sobre a regulação simpática cardiovascular, corrobora a hipótese de origem central da hiperatividade simpática observada, no grupo DECA, na presente tese.

Pode-se levantar a hipótese de que o estabelecimento de um perfil de hiperresponsividade às catecolaminas, secundário ao tratamento crônico com EA, some-se ao possível mecanismo central de aumento no tônus simpático (MCNUTT

et al., 1988; KENNEDY & LAWRENCE, 1993). É possível que a maior resposta cronotrópica encontrada nos corações do grupo DECA, quando da perfusão com a maior concentração de isoproterenol (ISO), origine-se no aumento na expressão de receptores β_2 -adrenérgicos no coração, conforme descrito por Penna *et al.* (2007). Em contrapartida, as alterações na geometria cardíaca, decorrentes da hipertrofia, parecem exercer um papel dominante sobre as respostas contráteis à estimulação adrenérgica, conforme evidenciaram os resultados de Norton *et al.* (2000), os quais mostraram um menor efeito inotrópico da estimulação com ISO em corações de ratos tratados com DECA. Sabe-se que, em frequências inferiores a 6 Hz (ou 360 bpm), o tecido ventricular de ratos apresenta relação força-frequência positiva (LAYLAND & KENTISH, 1999). Desta forma, é possível que, no presente trabalho, a não-utilização de dispositivo de *pacings* atrial tenha contribuído para que não fosse estatisticamente observada, nos corações dos animais tratados com DECA, uma menor resposta inotrópica ao ISO, pois, conforme anteriormente citado, na maior concentração do agonista, este grupo apresentou maior frequência cardíaca (FC) em relação ao CONTROLE, o que pode ter atenuado possíveis diferenças de contratilidade entre os grupos. No que tange à hipertrofia cardíaca, é provável que esta, conforme aqui apresentada, e tipicamente descrita no abuso, assim como em modelos experimentais de abuso de EA (NORTON *et al.*, 2000; NOTTIN *et al.*, 2006; BISSOLI *et al.*, 2009), seja desencadeada pelo crônico aumento no tônus simpático, com a possível contribuição adicional do aumento na expressão de receptores adrenérgicos cardíacos do tipo β_2 (LIGGETT *et al.*, 2000).

Em um estudo recentemente publicado, foi demonstrado que o tratamento crônico com altas doses de DECA, em ratos, resultou no aumento da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) cardíaco, com aumento local na atividade da

enzima conversora da angiotensina e na expressão de receptores AT_{1a} (ROCHA *et al.*, 2007a). A Angiotensina II (ANG II), através da ativação de receptores AT_1 e AT_2 , no coração, é capaz de mediar importantes alterações estruturais, tais como a hipertrofia cardíaca e o desenvolvimento de fibrose miocárdica (VARO *et al.*, 1999; BRILLA, 2000). Desta forma, em seu trabalho, Rocha *et al.* (2007a) defenderam a hipótese de envolvimento do SRA local sobre o remodelamento cardíaco maladaptativo, o qual é desencadeado pelo tratamento crônico com altas doses do EA. Sabe-se que aumentos nos níveis de ativação do SRA central associam-se ao crônico estado de hiperatividade simpática (ZHANG *et al.*, 1999; HUANG & LEENEN, 2009). No presente trabalho, na condição basal, os animais do grupo DECA apresentaram maior ingestão de água e menor ingestão de salina (solução de NaCl a 1,8%), em comparação ao grupo CONTROLE. A maior ingestão de água está de acordo com a hipótese de maior atividade do SRA no grupo DECA, pois sabe-se que a ANG II, no sistema nervoso central, atua como importante mediadora do comportamento dipsogênico (FITZSIMONS, 1998). É sabido que a neurotransmissão adrenérgica, em algumas áreas hipotalâmicas, é capaz de modular a regulação angiotensinérgica do apetite por sódio, e, nesse sentido, é possível que, em condições basais, o efeito central da noradrenalina sobre a ingestão de salina [redução, conforme descrito por De Paula *et al.* (1996)] possa se sobrepor ao efeito da ANG II (aumento no apetite por sódio). De maneira contrária, após o desafio de 24h em privação hídrica, o grupo DECA apresentou, em 300 minutos, maior ingestão de salina, em comparação ao CONTROLE. A privação hídrica representa um potente estímulo à ativação do SRA (RAMSAY *et al.*, 1988), tendo sido demonstrado neste modelo, em ratos, o envolvimento da ANG II central sobre o aumento na sede (MALVIN *et al.*, 1977) e no apetite por sódio (SATO *et al.*,

1996). Desta forma, é possível que o desafio tenha resultado no predomínio do efeito angiotensinérgico central, em relação ao adrenérgico, sobre o apetite por sódio nos animais DECA. Conforme esperado, foi também demonstrado o rápido efeito da privação hídrica sobre o comportamento dipsogênico, tendo sido os níveis de ingestão de água superiores nos animais DECA, durante todo o período de acompanhamento, em comparação ao grupo CONTROLE. O padrão de resposta encontrado, caracterizado pelo imediato aumento na ingestão de água, juntamente a um mais lento incremento no apetite por sal, é típico da estimulação com ANG II (FITZSIMONS, 1998).

As análises de VFC não-linear não apontaram diferenças entre os grupos para as propriedades fractais e de complexidade da FC. Apesar de já ter sido demonstrado valor prognóstico da análise de flutuação sem tendência (DFA) e entropia aproximada (ApEn) em humanos, em ratos, seu significado ainda não é claramente estabelecido, sendo ainda controversas, neste modelo animal, as possíveis relações entre o comportamento da DFA e ApEn e os níveis de atividade tônica simpática e parassimpática sobre o coração (AUBERT *et al.*, 2009). Também não foram registradas, no presente trabalho, diferenças entre os grupos para a pressão arterial sistólica, ou para a variabilidade da pressão arterial. Apesar de tipicamente descrita em humanos (SULLIVAN *et al.*, 1998; GRACE *et al.*, 2003), a hipertensão arterial frequentemente não é registrada em ratos expostos ao tratamento crônico com altas doses de decanoato de nandrolona (ROCHA *et al.*, 2007a; ANDRADE *et al.*, 2008). A maior sensibilidade barorreflexa, encontrada no grupo tratado com DECA, está de acordo com resultados de estudos prévios. Nesse sentido, Beutel *et al.* (2005), apesar de terem evidenciado uma menor bradicardia, demonstraram aumento da taquicardia barorreflexa em ratos tratados com

estanozolol, tendo El-Mas *et al.* (2001) descrito um efeito facilitador da testosterona sobre a atividade do barorreflexo, capaz de potencializar a resposta de seu componente bradicárdico.

6 CONCLUSÕES

O tratamento crônico com esteroide anabólico resultou em importantes alterações no controle dinâmico cardiovascular de ratos.

Os resultados do trabalho sugerem que a disfunção autonômica, representada pelo desvio do balanço simpato-vagal, na direção do aumento da modulação simpática, constitua, por si só, um importante mecanismo através do qual o abuso de EA seja associado ao aumento no risco cardiovascular, com maior suscetibilidade à ocorrência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca.

A disfunção autonômica parece constituir uma manifestação precoce da fisiopatologia cardiovascular do abuso de EA, a qual, ao longo de seu curso temporal, e em possível associação com o crônico aumento na atividade do SRA central, pode contribuir substancialmente para o desenvolvimento de alterações estruturais cardíacas, as quais são tipicamente associadas à instabilidade elétrica cardíaca e à arritmogênese.

O desenvolvimento de métodos de baixo custo para a aquisição do ECG em ratos não-anestesiados, juntamente à implementação de ferramentas computacionais para o estudo da dinâmica cardiovascular neste modelo animal, fizeram parte deste trabalho, e, além de terem dado viabilidade, na presente tese, ao estudo do controle cardiovascular integrado em um modelo de abuso de EA, permanecem como legado para o grupo de pesquisa, já sendo atualmente utilizados por alunos inseridos em diferentes projetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F. A.; SHANNON, D. C.; BERGER, A. C.; COHEN, R. J. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science**, v. 213, n. 4504, p. 220-222, 1981.

AMMAR, E. M.; SAID, S. A.; HASSAN, M. S. Enhanced vasoconstriction and reduced vasorelaxation induced by testosterone and nandrolone in hypercholesterolemic rabbits. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 3, p. 253-259, 2004.

ANDERSSON, B.; HIBELL, B.; BECK, F.; CHOQUET, M.; KOKKEVI, A.; FOTIOU, A.; MOLINARO, S.; NOCIAR, A.; SIEROSLAWSKI, J.; TRAPENCIERIS, M. **Alcohol and Drug Use Among European 17–18 Year Old Students - Data from the ESPAD Project**. Stockholm: The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs (ESPAD), 2007. 156 p. Disponível em http://www.espad.org/documents/Espad/ESPAD_reports/17_18_Year_Old_Students_Full_Report.pdf. Acesso em: 7 out. 2008.

ANDRADE, T. U.; SANTOS, M. C. S.; BUSATO, V. C. W.; MEDEIROS, A. R. S.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; BISSOLI, N. S. Higher Physiological Doses of Nandrolone Decanoate Do Not Influence the Bezold-Jarish Reflex Control of Bradycardia. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 1, p. 27-32, 2008.

APPLEGATE, E. A. & GRIVETTI, L. E. Search for the Competitive Edge: A History of Dietary Fads and Supplements. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 869-873, 1997.

AUBERT, A. E.; RAMAEKERS, D.; BECKERS, F.; BREEM, R.; DENEFF, C.; VAN DE WERF, F.; ECTOR, H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 60, n. 3, p. 197-213, 1999.

AUBERT, A. E.; VANDEPUT, S.; BECKERS, F.; LIU, J.; VERHEYDEN, B.; VAN HUFFEL, S. Complexity of cardiovascular regulation in small animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 367, n. 1892, p. 1239-1250, 2009.

BAGCHUS, W. M.; SMEETS, J. M. W.; VERHEUL, H. A. M.; DE JAGER-VAN DER VEEN, S. M.; PORT, A.; GEURTS, T. B. P. Pharmacokinetic Evaluation of Three Different Intramuscular Doses of Nandrolone Decanoate: Analysis of Serum and Urine Samples in Healthy Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2624-2630, 2005.

BAO, A. M.; FISCHER, D. F.; WU, Y. H.; HOL, E. M.; BALESAR, R.; UNMEHOPA, U. A.; ZHOU, J. N.; SWAAB, D. F. A direct androgenic involvement in the expression of human corticotropin-releasing hormone. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 567-576, 2006.

BAO, A. M. & SWAAB, D. F. Gender difference in age-related number of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in the human hypothalamic paraventricular nucleus and the role of sex hormones. **Neuroendocrinology**, v. 85, n. 1, p. 27-36, 2007.

BARDIN, C. W. & PAULSEN, C. A. The testes. In: WILLIAMS, R. W. (Org.). **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: WB Saunders, 1981. p. 293-354.

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J. T.; DOBS, A. S. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 11, p. 5108-5117, 2002.

BECKERS, F.; VERHEYDEN, B.; RAMAEKERS, D.; SWYNGHEDAUW, B.; AUBERT, A. E. Effects of autonomic blockade on non-linear cardiovascular variability indices in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5-6, p. 431-439, 2006.

BERGINK, E. W.; JANSSEN, P. S.; TURPIJN, E. W.; VAN DER VIES, J. Comparison of the receptor binding properties of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions. **J Steroid Biochem**, v. 22, n. 6, p. 831-6, 1985.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 93, n. 1, p. 43-48, 2005.

BICKELMAN, C.; FERRIES, L.; EATON, R. P. Impotence related to anabolic steroid use in a body builder. Response to clomiphene citrate. **Western Journal of Medicine**, v. 162, n. 2, p. 158-160, 1995.

BISSOLI, N. S.; MEDEIROS, A. R. S.; SANTOS, M. C. S.; BUSATO, V. C. W.; JARSKE, R. D.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; DE ANDRADE, T. U. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 6, p. 379-384, 2009.

BITRAN, D.; KELLOGG, C. K.; HILVERS, R. J. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA(A) receptors in the rat. **Hormones and Behavior**, v. 27, n. 4, p. 568-583, 1993.

BOLDING, G.; SHERR, L.; ELFORD, J. Use of anabolic steroids and associated health risks among gay men attending London gyms. **Addiction**, v. 97, n. 2, p. 195-203, 2002.

BRICOUT, V. & WRIGHT, F. Update on nandrolone and norsteroids: how endogenous or xenobiotic are these substances? **European Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 1, p. 1-12, 2004.

BRILLA, C. G. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis: Editorial. **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 1, p. 1-3, 2000.

BROWER, K. J. Anabolic steroid abuse and dependence. **Current Psychiatry Reports**, v. 4, n. 5, p. 377-387, 2002.

CANUTO, M. H. A.; FERREIRA, R. A.; GUIMARÃES, E. M. B. Uso e abuso de drogas ilícitas por jovens do 1º ano da Universidade Federal de Goiás. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 24, n. 2, p. 135-142, 2006.

CARPENTER, P. C. Performance-Enhancing Drugs in Sport. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 481-495, 2007.

CARRILLO, M.; RICCI, L. A.; MELLONI JR, R. H. Adolescent anabolic androgenic steroids reorganize the glutamatergic neural circuitry in the hypothalamus. **Brain Research**, v. 1249, n. C, p. 118-127, 2009.

CARSON, J. A.; LEE, W. J.; MCCLUNG, J.; HAND, G. A. Steroid receptor concentration in aged rat hindlimb muscle: Effect of anabolic steroid administration. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 1, p. 242-250, 2002.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. **Esteróides Anabolizantes**. São Paulo: CEBRID - Unifesp/EPM, 2002. Disponível em http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/anabolizantes_.htm. Acesso em: 14 jul. 2004.

CERUTTI, C.; BARRES, C.; PAULTRE, C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: Assessment by spectral analysis. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 5 35-5, p. H1993-H2000, 1994.

CHANG, C. C.; HWANG, J. S.; CHAN, C. C.; CHENG, T. J. Interaction effects of ultrafine carbon black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 7, p. 1012-1017, 2007.

CHRIST, M. & WEHLING, M. Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails? **Cardiovascular Research**, v. 40, n. 1, p. 34, 1998.

COHEN, H.; BENJAMIN, J.; GEVA, A. B.; MATAR, M. A.; KAPLAN, Z.; KOTLER, M. Autonomic dysregulation in panic disorder and in post-traumatic stress disorder: Application of power spectrum analysis of heart rate variability at rest and in response to recollection of trauma or panic attacks. **Psychiatry Research**, v. 96, n. 1, p. 1-13, 2000.

COHEN, M. A. & TAYLOR, J. A. Short-term cardiovascular oscillations in man: Measuring and modelling the physiologies. **Journal of Physiology**, v. 542, n. 3, p. 669-683, 2002.

CROWTHER, N. The state of the modern Olympics: citius, altius, fortius? **European Review**, v. 12, n. 03, p. 445-460, 2004.

CSA. COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS. Drug abuse in athletes: Anabolic steroids and human growth hormones. **Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v. 259, n. 11, p. 1703-1705, 1988.

_____. COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS. Medical and nonmedical uses of anabolic-androgenic steroids. **Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v. 264, n. 22, p. 2923-2927, 1990.

D'ANDREA, A.; CASO, P.; SALERNO, G.; SCARAFI, R.; DE CORATO, G.; MITA, C.; DI SALVO, G.; SEVERINO, S.; CUOMO, S.; LICCARDO, B.; ESPOSITO, N.; CALABRÀ², R. Left ventricular early myocardial dysfunction after chronic misuse of

anabolic androgenic steroids: A Doppler myocardial and strain imaging analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 3, p. 149-155, 2007.

DAL PIZZOL, T. S.; BRANCO, M. M. N.; CARVALHO, R. M. A.; PASQUALOTTI, A.; MACIEL, E. N.; MIGOTT, A. M. B. Uso não-médico de medicamentos psicoativos entre escolares do ensino fundamental e médio no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 109-115, 2006.

DE ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, J.; SILVA, M. S. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 10, n. 3, p. 13-18, 2002.

DE MICHELI, D. & FORMIGONI, M. L. O. S. Drug use by Brazilian students: associations with family, psychosocial, health, demographic and behavioral characteristics. **Addiction**, v. 99, n. 5, p. 570-578, 2004.

DE PAULA, P. M.; SATO, M. A.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR, L. A. Effects of central alpha-adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neuroscience Letters**, v. 214, n. 2-3, p. 155-158, 1996.

DE PERGOLA, G. The adipose tissue metabolism: Role of testosterone and dehydroepiandrosterone. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. SUPPL. 2, p. S59-S63, 2000.

DE ROSE, E. H. Doping in Athletes—an Update. **Clinics in Sports Medicine**, v. 27, n. 1, p. 107-130, 2008.

DE WARDENER, H. E. The hypothalamus and hypertension. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1599-1658, 2001.

EBENBICHLER, C. F.; STURM, W.; GÄNZER, H.; BODNER, J.; MANGWETH, B.; RITSCH, A.; SANDHOFER, A.; LECHLEITNER, M.; FÖGER, B.; PATSCH, J. R. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. **Atherosclerosis**, v. 158, n. 2, p. 483-490, 2001.

EDINGER, K. L. & FRYE, C. A. Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5 alpha-reduced metabolites in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 5, p. 418-430, 2005.

EL-MAS, M. M.; AFIFY, E. A.; MOHY EL-DIN, M. M.; OMAR, A. G.; SHARABI, F. M. Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: Role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 754-763, 2001.

ESLER, M. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias. **Clinical Autonomic Research**, v. 2, n. 2, p. 133-135, 1992.

EVANS, N. A. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 534, 2004.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H. C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple Actions of Steroid Hormones-A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 513-556, 2000.

FANTON, L.; BELHANI, D.; VAILLANT, F.; TABIB, A.; GOMEZ, L.; DESCOTES, J.; DEHINA, L.; BUI-XUAN, B.; MALICIER, D.; TIMOUR, Q. Heart lesions associated with anabolic steroid abuse: Comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, n. 4, p. 317-323, 2009.

FINESCHI, V.; BAROLDI, G.; MONCIOTTI, F.; REATTELLI, L. P.; TURILLAZZI, E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: A pathologic study. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 125, n. 2, p. 253-255, 2001.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583-686, 1998.

FORTUNATO, R. S.; MARASSI, M. P.; CHAVES, E. A.; NASCIMENTO, J. H. M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38, n. 2, p. 256-261, 2006.

FORTUNATO, R. S.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Abuso de esteróides anabolizantes e seu impacto sobre a função tireóidea. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 9, p. 1417-1424, 2007.

FRANKE, W. W. & BERENDONK, B. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1262-1279, 1997.

FREEMAN, E. R.; BLOOM, D. A.; MCGUIRE, E. J. A brief history of testosterone. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 2, p. 371-373, 2001.

FRIEDL, K. E.; DETTORI, J. R.; HANNAN, C. J.; PATIENCE, T. H.; PLYMATE, S. R. Comparison of the effects of high dose testosterone and 19-nortestosterone to a replacement dose of testosterone on strength and body composition in normal men. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4-6, p. 607-612, 1991.

FRIZON, F.; MACEDO, S. M.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Rechim e Passo Fundo. **Revista de Ciências Farmacêuticas: básica e aplicada**, v. 26, n. 3, p. 227-232, 2005.

GOLDBERGER, A. L.; AMARAL, L. A.; GLASS, L.; HAUSDORFF, J. M.; IVANOV, P. C.; MARK, R. G.; MIETUS, J. E.; MOODY, G. B.; PENG, C. K.; STANLEY, H. E. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: components of a new research resource for complex physiologic signals. **Circulation**, v. 101, n. 23, p. E215-220, 2000.

GOLDBERGER, J. J.; CAIN, M. E.; HOHNLOSER, S. H.; KADISH, A. H.; KNIGHT, B. P.; LAUER, M. S.; MARON, B. J.; PAGE, R. L.; PASSMAN, R. S.; SISCOVICK, D.; STEVENSON, W. G.; ZIPES, D. P. American Heart Association/American College of

Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: A scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. **Circulation**, v. 118, n. 14, p. 1497-1518, 2008.

GORAYSKI, P.; THOMPSON, C. H.; SUBHASH, H. S.; THOMAS, A. C. Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use. **British Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 1, p. 74, 2008.

GRACE, F.; SCULTHORPE, N.; BAKER, J.; DAVIES, B. Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS). **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 6, n. 3, p. 307-312, 2003.

GÜNES, Y.; ERBAS, C.; OKUYAN, E.; BABALIK, E.; GÜRMEN, T. Myocardial infarction with intracoronary thrombus induced by anabolic steroids. **Anadolu Kardiyoloji Dergisi**, v. 4, n. 4, p. 357-358, 2004.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

GUZZETTI, S.; PICCALUGA, E.; CASATI, R.; CERUTTI, S.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Sympathetic predominance in essential hypertension: A study employing spectral analysis of heart rate variability. **Journal of Hypertension**, v. 6, n. 9, p. 711-717, 1988.

HANNAN, C. J.; FRIEDL, K. E.; ZOLD, A.; KETTLER, T. M.; PLYMATE, S. R. Psychological and serum homovanillic acid changes in men administered androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 16, n. 4, p. 335-343, 1991.

HASSAGER, C.; PODENPHANT, J.; RIIS, B. J.; JOHANSEN, J. S.; JENSEN, J.; CHRISTIANSEN, C. Changes in soft tissue body composition and plasma lipid metabolism during nadrolone decanoate therapy in postmenopausal osteoporotic women. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 38, n. 3, p. 238-242, 1989.

HON, E. H. & LEE, S. T. Electronic evaluation of the fetal heart rate. VIII. Patterns preceding fetal death, further observations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 87, n., p. 814-26, 1963.

HOSEINI, L.; ROOZBEH, J.; SAGHEB, M.; KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 226-230, 2009.

HOWARTH, F. C.; JACOBSON, M.; SHAFIULLAH, M.; ADEGHATE, E. Long-term effects of type 2 diabetes mellitus on heart rhythm in the Goto-Kakizaki rat. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 3, p. 362-369, 2008.

HUANG, B. S. & LEENEN, F. H. H. The brain renin-angiotensin-aldosterone system: A major mechanism for sympathetic hyperactivity and left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction. **Current Heart Failure Reports**, v. 6, n. 2, p. 81-88, 2009.

JOHNSTON, L. D.; O'MALLEY, P. M.; BACHMAN, J. G.; SCHULENBERG, J.
Monitoring the Future: National Survey Results on Drug Use, 1975-2007. Volume I: Secondary School Students (NIH Publication No. 08-6418A). Bethesda: National Institute on Drug Abuse (NIDA), 2008. 738 p. Disponível em <http://www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/overview2007.pdf>. Acesso em: 7 out. 2008.

JOUMAA, W. H. & LEÓTY, C. Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscles. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 3, p. 397-403, 2001.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J.; POPE, H. G. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? **Drug and Alcohol Dependence**, v. 98, n. 1-2, p. 1-12, 2008.

KAPLAN, D. & STAFFIN, P. Software for Heart Rate Variability. <http://www.maclester.edu/~kaplan/hrv/doc/>, 1998.

KASIKCIOGLU, E.; OFLAZ, H.; ARSLAN, A.; TOPCU, B.; KASIKCIOGLU, H. A.; UMMAN, B.; BUGRA, Z.; KAYSERILIOGLU, A. Aortic elastic properties in athletes using anabolic-androgenic steroids. **International Journal of Cardiology**, v. 114, n. 1, p. 132-134, 2007.

KASIKCIOGLU, E.; OFLAZ, H.; UMMAN, B.; BUGRA, Z. Androgenic anabolic steroids also impair right ventricular function. **International Journal of Cardiology**, v. 134, n. 1, p. 123-125, 2009.

KENNEDY, M. C. & LAWRENCE, C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. **Medical Journal of Australia**, v. 158, n. 5, p. 346-348, 1993.

KENT, K. M.; SMITH, E. R.; REDWOOD, D. R.; EPSTEIN, S. E. Electrical stability of acutely ischemic myocardium. Influences of heart rate and vagal stimulation. **Circulation**, v. 47, n. 2, p. 291-298, 1973.

KESELBRENER, L.; KESELBRENER, M.; AKSELROD, S. Nonlinear high pass filter for R-wave detection in ECG signal. **Medical Engineering and Physics**, v. 19, n. 5, p. 481-484, 1997.

KLEIGER, R. E.; MILLER, J. P.; BIGGER JR, J. T. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 59, n. 4, p. 256-262, 1987.

KOCHAKIAN, C. & YESALIS, C. E. Anabolic androgenic steroids: A historical perspective and definition. In: YESALIS, C. E. (Org.). **Anabolic Steroids in Sport and Exercise - 2nd ed.** Champaign: Human Kinetics, p. 3-33, 1993.

KOLMAN, B. S.; VERRIER, R. L.; LOWN, B. The effect of vagus nerve stimulation upon vulnerability of the canine ventricle. Role of sympathetic-parasympathetic interactions. **Circulation**, v. 52, n. 4, p. 578-585, 1975.

KOUVELAS, D.; POURZITAKI, C.; PAPAISIS, G.; DAGKLIS, T.; DIMOU, K.; KRAUS, M. M. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central

androgenic receptors. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 7, p. 925-934, 2008.

KRÜGER, C.; LANDERER, V.; ZUGCK, C.; EHMKE, H.; KUÛBLER, W.; HAASS, M. The bradycardic agent zatebradine enhances baroreflex sensitivity and heart rate variability in rats early after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 4, p. 900-912, 2000.

KUHN, C. M. Anabolic Steroids. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, n. 1, p. 411-434, 2002.

LANE, H. A.; GRACE, F.; SMITH, J. C.; MORRIS, K.; COCKCROFT, J.; SCANLON, M. F.; DAVIES, J. S. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 7, p. 483-488, 2006.

LAROCHE, G. P. Steroid anabolic drugs and arterial complications in an athlete - A case history. **Angiology**, v. 41, n. 11, p. 964-969, 1990.

LAYLAND, J. & KENTISH, J. C. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 1, p. H9-H18, 1999.

LEVY, M. N. Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. **Circulation Research**, v. 29, n. 5, p. 437-445, 1971.

LIANG, M. T. C.; FAULSON, D. J.; KOPP, S. J.; GLONEK, T.; MENESES, P.; GIERKE, L. W.; SCHWARTZ, F. N. Effects of anabolic steroids and endurance exercise on cardiac performance. **International Journal of Sports Medicine**, v. 14, n. 6, p. 324-329, 1993.

LIGGETT, S. B.; TEPE, N. M.; LORENZ, J. N.; CANNING, A. M.; JANTZ, T. D.; MITARAI, S.; YATANI, A.; DORN II, G. W. Early and delayed consequences of beta2-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: Critical role for expression level. **Circulation**, v. 101, n. 14, p. 1707-1714, 2000.

LINDBLOM, J.; KINDLUNDH, A. M. S.; NYBERG, F.; BERGSTROÛM, L.; WIKBERG, J. E. S. Anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate reduces hypothalamic proopiomelanocortin mRNA levels. **Brain Research**, v. 986, n. 1-2, p. 139-147, 2003.

LISE, M. L. Z.; GAMA E SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 364-370, 1999.

LOMBARDI, F.; PORTA, A.; MARZEGALLI, M.; FAVALE, S.; SANTINI, M.; VINCENTI, A.; DE ROSA, A. Heart rate variability patterns before ventricular tachycardia onset in patients with an implantable cardioverter defibrillator. **American Journal of Cardiology**, v. 86, n. 9, p. 959-963, 2000.

LOMBARDI, F.; SANDRONE, G.; PERNPRUNER, S.; SALA, R.; GARIMOLDI, M.; CERUTTI, S.; BASELLI, G.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 60, n. 16, p. 1239-1245, 1987.

LÖSEL, R. M.; FALKENSTEIN, E.; FEURING, M.; SCHULTZ, A.; TILLMANN, H. C.; ROSSOL-HASEROTH, K.; WEHLING, M. Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 965-1016, 2003.

LUCAS, A. C.; PARENTE, R. C.; PIKANÇO, N. S.; CONCEIÇÃO, D. A.; COSTA, K. R.; MAGALHÃES, I. R.; SIQUEIRA, J. C. Uso de psicotrópicos entre universitários da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 663-71, 2006.

LUKE, J. L.; FARB, A.; VIRMANI, R.; SAMPLE, R. H. B. Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: Pathological and toxicological findings. **Journal of Forensic Sciences**, v. 35, n. 6, p. 1441-1447, 1990.

LYNGBERG, K. K. Myocardial infarction and death of a body builder after using anabolic steroids (abstract). **Ugeskrift for Laeger**, v. 153, n. 8, p. 587-588, 1991.

MÄENPÄÄ, M.; PENTTILÄ, J.; LAITIO, T.; KAISTI, K.; KUUSELA, T.; HINKKA, S.; SCHEININ, H. The effects of surgical levels of sevoflurane and propofol anaesthesia on heart rate variability. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 24, n. 7, p. 626-633, 2007.

MALVIN, R. L.; MOUW, D.; VANDER, A. J. Angiotensin: physiological role in water deprivation induced thirst of rats. **Science**, v. 197, n. 4299, p. 171-173, 1977.

MARAVELIAS, C.; DONA, A.; STEFANIDOU, M.; SPILIOPOULOU, C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes A constant threat. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 3, p. 167-175, 2005.

MARON, B. J. Hypertrophic cardiomyopathy. **Lancet**, v. 350, n. 9071, p. 127-133, 1997.

_____. Sudden death in young athletes. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 11, p. 1064-1075, 2003.

MARON, B. J.; ROBERTS, W. C.; MCALLISTER, H. A. Sudden death in young athletes. **Circulation**, v. 62, n. 2, p. 218-229, 1980.

MARTINS, J. B. & ZIPES, D. P. Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. **Circulation Research**, v. 46, n. 1, p. 100-110, 1980.

MCNUTT, R. A.; FERENCHICK, G. S.; KIRLIN, P. C.; HAMLIN, N. J. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. **American Journal of Cardiology**, v. 62, n. 1, p. 164, 1988.

MODLINSKI, R. & FIELDS, K. B. The effect of anabolic steroids on the gastrointestinal system, kidneys, and adrenal glands. **Current sports medicine reports.**, v. 5, n. 2, p. 104-109, 2006.

NAYLOR, A. H.; GARDNER, D.; ZAICHKOWSKY, L. Drug use patterns among high school athletes and nonathletes. **Adolescence**, v. 36, n. 144, p. 627-639, 2001.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Anabolic Steroid Abuse**. Bethesda: Research Report Series, 2006. Disponível em <http://www.nida.nih.gov/PDF/RRSteroids.pdf>. Acesso em: 8 out. 2008.

NOAKES, T. D. Tainted Glory-Doping and Athletic Performance. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 9, p. 847-849, 2004.

NOLAN, J.; BATIN, P. D.; ANDREWS, R.; LINDSAY, S. J.; BROOKSBY, P.; MULLEN, M.; BAIG, W.; FLAPAN, A. D.; COWLEY, A.; PRESCOTT, R. J.; NEILSON, J. M. M.; FOX, K. A. A. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: Results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-Heart). **Circulation**, v. 98, n. 15, p. 1510-1516, 1998.

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

NOTO, A. R.; BAPTISTA, M. C.; FARIA, S. T.; NAPPO, A. S.; GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. A. Drogas e saúde na imprensa brasileira: uma análise de artigos publicados em jornais e revistas. **Cad Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2003.

NOTTIN, S.; NGUYEN, L. D.; TERBAH, M.; OBERT, P. Cardiovascular effects of androgenic anabolic steroids in male bodybuilders determined by tissue Doppler imaging. **American Journal of Cardiology**, v. 97, n. 6, p. 912-915, 2006.

OLIVARDIA, R.; POPE, H. G.; HUDSON, J. I. Muscle dysmorphia in male weightlifters: A case-control study. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 8, p. 1291-1296, 2000.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circulation Research**, v. 59, n. 2, p. 178-193, 1986.

PAGANI, M.; SOMERS, V.; FURLAN, R.; DELL'ORTO, S.; CONWAY, J.; BASELLI, G.; CERUTTI, S.; SLEIGHT, P.; MALLIANI, A. Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension. **Hypertension**, v. 12, n. 6, p. 600-610, 1988.

PALMA, A.; ABREU, R. A.; CUNHA, C. A. Comportamentos de risco e vulnerabilidade entre estudantes de Educação Física. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 1, p. 117-126, 2007.

PARATI, G.; DIRIENZO, M.; MANCIA, G. How to measure baroreflex sensitivity: From the cardiovascular laboratory to daily life. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2000.

PARLOW, J.; VIALE, J. P.; ANNAT, G.; HUGHSON, R.; QUINTIN, L. Spontaneous cardiac baroreflex in humans: Comparison with drug-induced responses. **Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1058-1068, 1995.

PAVLATOS, A. M.; FULTZ, O.; MONBERG, M. J.; VOOTKUR, A. Review of oxymetholone: a 17 α -alkylated anabolic-androgenic steroid. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 6, p. 789-801, 2001.

PENG, C. K.; HAVLIN, S.; HAUSDORFF, J. M.; MIETUS, J. E.; STANLEY, H. E.; GOLDBERGER, A. L. Fractal mechanisms and heart rate dynamics: Long-range correlations and their breakdown with disease. **Journal of Electrocardiology**, v. 28, n. SUPPL., p. 59-64, 1995a.

PENG, C. K.; HAVLIN, S.; STANLEY, H. E.; GOLDBERGER, A. L. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. **Chaos**, v. 5, n. 1, p. 82-87, 1995b.

PEREIRA-JUNIOR, P. P. **Disfunção na regulação autonômica cardíaca em ratos cronicamente tratados com esteróide anabólico**. 2004. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

PEREIRA-JUNIOR, P. P.; CHAVES, E. A.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; MASUDA, M. O.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C.; NASCIMENTO, J. H. M. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **European Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 5, p. 487-494, 2006.

PEREIRA-JUNIOR, P. P.; MAROCOLO, M.; RODRIGUES, F. P.; MEDEI, E.; NASCIMENTO, J. H. M. Noninvasive method for electrocardiogram recording in conscious rats: feasibility for heart rate variability analysis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (aceito para publicação em 15 out. 2009).

PINCUS, S. M. Approximate entropy as a measure of system complexity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2297-2301, 1991.

PONIKOWSKI, P.; CHUA, T. P.; PIEPOLI, M.; ONDUSOVA, D.; WEBB-PEPLOE, K.; HARRINGTON, D.; ANKER, S. D.; VOLTERRANI, M.; COLOMBO, R.; MAZZUERO, G.; GIORDANO, A.; COATS, A. J. S. Augmented peripheral chemosensitivity as a potential input to baroreflex impairment and autonomic imbalance in chronic heart failure. **Circulation**, v. 96, n. 8, p. 2586-2594, 1997.

RAMSAY, D. J.; THRASHER, T. N.; BIE, P. Endocrine components of body fluid homeostasis. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 90, n. 4, p. 777-780, 1988.

ROCHA, F. L.; CARMO, E. C.; ROQUE, F. R.; HASHIMOTO, N. Y.; ROSSONI, L. V.; FRIMM, C.; ANÉAS, I.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, J. E.; OLIVEIRA, E. M. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, p. H3575-H3583, 2007a.

ROCHA, V. M.; CALIL, C. M.; FERREIRA, R.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. **Stress-the International Journal on the Biology of Stress**, v. 10, n. 4, p. 326-331, 2007b.

ROWAN III, W. H.; CAMPEN, M. J.; WICHERS, L. B.; WATKINSON, W. P. Heart rate variability in rodents: Uses and caveats in toxicological studies. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 28-51, 2007.

RUBINOW, D. R. & SCHMIDT, P. J. Androgens, brain, and behavior. **American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 8, p. 974-984, 1996.

SANTAMARINA, R. D.; BESOCKE, A. G.; ROMANO, L. M.; IOLI, P. L.; GONORAZKY, S. E. Ischemic stroke related to anabolic abuse. **Clinical Neuropharmacology**, v. 31, n. 2, p. 80-85, 2008.

SANYAL, S. N.; ARITA, M.; ONO, K. Inhomogeneous derangement of cardiac autonomic nerve control in diabetic rats. **Circulation Journal**, v. 66, n. 3, p. 283-288, 2002.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA JR, L. A. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiology and Behavior**, v. 60, n. 4, p. 1099-1104, 1996.

SCHÄNZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1001-1020, 1996.

SCHLUSSMAN, S. D.; ZHOU, Y.; JOHANSSON, P.; KIURU, A.; HO, A.; NYBERG, F.; KREEK, M. J. Effects of the androgenic anabolic steroid, nandrolone decanoate, on adrenocorticotropin hormone, corticosterone and proopiomelanocortin, corticotropin releasing factor (CRF) and CRF receptor1 mRNA levels in the hypothalamus, pituitary and amygdala of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 284, n. 3, p. 190-194, 2000.

SCOTT 3RD, M. J. & SCOTT, A. M. Effects of anabolic-androgenic steroids on the pilosebaceous unit. **Cutis**, v. 50, n. 2, p. 113-6, 1992.

SETHI, R.; SAINI, H. K.; GUO, X.; WANG, X.; ELIMBAN, V.; DHALLA, N. S. Dependence of changes in β -adrenoceptor signal transduction on type and stage of cardiac hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 3, p. 978-984, 2007.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355-1390, 2001.

SILVA, L. & MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.

SJÖQVIST, F.; GARLE, M.; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **Lancet**, v. 371, n. 9627, p. 1872-82, 2008.

SKELTON, F. R. The production of hypertension, nephrosclerosis and cardiac lesions by methylandrostenediol treatment in the rat. **Endocrinology**, v. 53, n. 5, p. 492-505, 1953.

STRAUSS, R. H. & YESALIS, C. E. Anabolic Steroids in the Athlete. **Annual Reviews in Medicine**, v. 42, n. 1, p. 449-457, 1991.

SULLIVAN, M. L.; MARTINEZ, C. M.; GENNIS, P.; GALLAGHER, E. J. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 41, n. 1, p. 1-15, 1998.

TAHTAMOUNI, L. H.; MUSTAFA, N. H.; ALFAOURI, A. A.; HASSAN, I. M.; ABDALLA, M. Y.; YASIN, S. R. Prevalence and risk factors for anabolic-androgenic steroid abuse among Jordanian collegiate students and athletes. **The European Journal of Public Health**, v. 18, n. 6, p. 661-665, 2008.

TAMAKI, T.; SHIRAIISHI, T.; TAKEDA, H.; MATSUMIYA, T.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 1, p. 32-38, 2003.

TARVAINEN, M. P.; NISKANEN, J. P.; LIPPONEN, J. A.; RANTA-AHO, P. O.; KARJALAINEN, P. A. Kubios HRV - a software for advanced heart rate variability analysis. In: SLOTEN, J. VERDONCK, P. NYSSSEN, M. HAUEISEN, J. (Org.). **IFMBE Proceedings ECIFMBE 2008. 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering**. Antwerp: Springer-Verlag, 2008. p. 1022-1025.

TASK FORCE of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

THIBLIN, I.; MOBINI-FAR, H.; FRISK, M. Sudden unexpected death in a female fitness athlete, with a possible connection to the use of anabolic androgenic steroids (AAS) and ephedrine. **Forensic Science International**, v. 184, n. 1-3, p. e7-e11, 2009.

THIBLIN, I.; RUNESON, B.; RAJS, J. Anabolic Androgenic Steroids and Suicide. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 223-231, 1999.

THOMPSON, P. D.; SADANIANTZ, A.; CULLINANE, E. M.; BODZIONY, K. S.; CATLIN, D. H.; TOREK-BOTH, G.; DOUGLAS, P. S. Left ventricular function is not impaired in weight-lifters who use anabolic steroids. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 19, n. 2, p. 278-282, 1992.

TORRES-BUGARÍN, O.; COVARRUBIAS-BUGARÍN, R.; ZAMORA-PEREZ, A. L.; TORRES-MENDOZA, B. M. G.; GARCÍA-ULLOA, M.; MARTÍNEZ-SANDOVAL, F. G. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. **British Journal of Sports Medicine**, v. 41, n. 9, p. 592-596, 2007.

TRACK star Marion Jones pleads guilty to doping deception. **CNN.com/US**, New York, 5 out. 2007. Disponível em www.cnn.com/2007/US/10/05/jones.doping/index.html. Acesso em: 3 out. 2008.

TRIFUNOVIC, B.; NORTON, G. R.; DUFFIELD, M. J.; AVRAAM, P.; WOODIWISS, A. J. An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 3 37-3, p. H1096-H1105, 1995.

TSUJI, H.; LARSON, M. G.; VENDITTI JR, F. J.; MANDERS, E. S.; EVANS, J. C.; FELDMAN, C. L.; LEVY, D. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 94, n. 11, p. 2850-2855, 1996.

UECHI, M.; ASAI, K.; OSAKA, M.; SMITH, A.; SATO, N.; WAGNER, T. E.; ISHIKAWA, Y.; HAYAKAWA, H.; VATNER, D. E.; SHANNON, R. P.; HOMCY, C. J.; VATNER, S. F. Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G(s?). **Circulation Research**, v. 82, n. 4, p. 416-423, 1998.

URHAUSEN, A.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart**, v. 90, n. 5, p. 496-501, 2004.

URHAUSEN, A.; HOLPES, R.; KINDERMANN, W. One- and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 58, n. 6, p. 633-640, 1989.

VANOLI, E.; DE FERRARI, G. M.; STRAMBA-BADIALE, M.; HULL JR, S. S.; FOREMAN, R. D.; SCHWARTZ, P. J. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 68, n. 5, p. 1471-1481, 1991.

VARO, N.; ETAYO, J. C.; ZALBA, G.; BEAUMONT, J.; IRABURU, M. J.; MONTIEL, C.; GIL, M. J.; MONREAL, I.; DÍEZ, J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 17, n. 1, p. 107-114, 1999.

VERROKEN, M. Drug use and abuse in sport. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1-23, 2000.

VICENCIO, J. M.; IBARRA, C.; ESTRADA, M.; CHIONG, M.; SOTO, D.; PARRA, V.; DIAZ-ARAYA, G.; JAIMOVICH, E.; LAVANDERO, S. Testosterone Induces an Intracellular Calcium Increase by a Nongenomic Mechanism in Cultured Rat Cardiac Myocytes. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1386-1395, 2006.

WALLACE, M. B. Overview of Anabolic/Androgenic Hormones and Strength. In: JACKSON, C. G. R. (Org.). **Nutrition and the Strength Athlete**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 133-156.

WAKI, H.; KATAHIRA, K.; POLSON, J. W.; KASPAROV, S.; MURPHY, D.; PATON, J. F. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 1, p. 201-213, 2006.

WOOD, R. I. Anabolic–androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 490-506, 2008.

YAMADA, T.; MOCHIDUKI, A.; SUGIMOTO, Y.; SUZUKI, Y.; ITOI, K.; INOUE, K. Prolactin-releasing peptide regulates the cardiovascular system via corticotrophin-releasing hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 6, p. 586-593, 2009.

YAMAMOTO, Y.; HUGHSON, R. L.; PETERSON, J. C. Autonomic control of heart rate during exercise studied by heart rate variability spectral analysis. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, n. 3, p. 1136-1142, 1991.

YESALIS, C. E. & BAHRKE, M. S. Doping among adolescent athletes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 25-35, 2000.

YESALIS, C. E.; KENNEDY, N. J.; KOPSTEIN, A. N.; BAHRKE, M. S. Anabolic-androgenic steroid use in the United States. **JAMA**, v. 270, n. 10, p. 1217-1221, 1993.

ZHANG, B. & SANNAJUST, F. Diurnal rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in adult and old male Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 70, n. 3-4., p. 375-380, 2000.

ZHANG, W.; HUANG, B. S.; LEENEN, F. H. H. Brain renin-angiotensin system and sympathetic hyperactivity in rats after myocardial infarction. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 5 45-5, p. H1608-H1615, 1999.

ZHENG, Z. J.; CROFT, J. B.; GILES, W. H.; MENSAH, G. A. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. **Circulation**, v. 104, n. 18, p. 2158-2163, 2001.

APÊNDICE A

Estrutura básica do principal algoritmo usado na análise de variabilidade cardiovascular e sensibilidade barorreflexa no domínio da frequência.

```
% Analise.m
% por Pedro Paulo Pereira Junior - 31/08/2008

vip
vpa

ip_trecho10_det = detrend(ip_trecho10,'linear');
pas_trecho10_det = detrend(pas_trecho10,'linear');

[PxxPAS,FPAS] = PWELCH(pas_trecho10_det,hanning(513),256,1024,10);

[PxxIP,FIP] = PWELCH(ip_trecho10_det,hanning(513),256,1024,10);

[CxyCr,FCr] =
CPSD(pas_trecho10_det,ip_trecho10_det,hanning(513),256,1024,10);
CxyCr = abs(CxyCr);

%[Txy,FT] =
tfestimate(pas_trecho10_det,ip_trecho10_det,hanning(513),256,1024,10);
% x=PAS que é o input; y=IP que é o output;

[CxyCo,FCo] =
MSCOHERE(pas_trecho10_det,ip_trecho10_det,hanning(513),256,1024,10);

%[Cxy,F] = MSCOHERE(pas_trecho10_det,ip_trecho10_det,65,32,128,10);

fullscreen = get(0,'ScreenSize');
figure('Position',[0 100 fullscreen(3) fullscreen(4)-100],'Color',[.940
.940 .940]);
subplot(2,2,1); plot(FIP(1:308),PxxIP(1:308)); hold on, title('Intervalos
de Pulso'),xlabel('Freq (Hz)'),ylabel('Potencia (ms2)');
subplot(2,2,2); plot(FCr(1:308),CxyCr(1:308)); hold on, title('Espectro
Cruzado (módulo)'),xlabel('Freq (Hz)'),ylabel(' ');
subplot(2,2,3); plot(FPAS(1:308),PxxPAS(1:308)); hold on, title('Pressão
Arterial Sistólica'),xlabel('Freq (Hz)'),ylabel('Potencia (mmHg2)');
subplot(2,2,4); plot(FCo(1:308),CxyCo(1:308),'.-'),
title('Coerência'),xlabel('Freq (Hz)'),ylabel(' ');

% INTEGRA E RESULTS IP:
bMBF_ip=FIP(1:21);
bBF_ip=FIP(22:82);
bAF_ip=FIP(83:308);
pMBF_ip=PxxIP(1:21);
pBF_ip=PxxIP(22:82);
pAF_ip=PxxIP(83:308);

mbf_ip = trapz(bMBF_ip,pMBF_ip);
bf_ip = trapz(bBF_ip,pBF_ip);
af_ip = trapz(bAF_ip,pAF_ip);
razao_ip = bf_ip/af_ip;
bfnu_ip = bf_ip/(bf_ip+af_ip);
afnu_ip = af_ip/(bf_ip+af_ip);
total_ip = (mbf_ip+bf_ip+af_ip);
```

```
[ num2str('Dom. Freq. IP'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('Pot mBF'),10,...
  num2str('Pot BF'),10,...
  num2str('Pot AF'),10,...
  num2str('BF/AF'),10,...
  num2str('BF nu'),10,...
  num2str('AF nu'),10,...
  num2str('Pot Total'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str(mbf_ip),10,...
  num2str(bf_ip),10,...
  num2str(af_ip),10,...
  num2str(razao_ip),10,...
  num2str(bfnu_ip),10,...
  num2str(afnu_ip),10,...
  num2str(total_ip),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('-----'),10 ]
```

```
% INTEGRA E RESULTS PA:
```

```
bMBF_pas=FPAS(1:21);
bBF_pas=FPAS(22:82);
bAF_pas=FPAS(83:308);
pMBF_pas=PxxPAS(1:21);
pBF_pas=PxxPAS(22:82);
pAF_pas=PxxPAS(83:308);
```

```
mbf_pas = trapz(bMBF_pas,pMBF_pas);
bf_pas = trapz(bBF_pas,pBF_pas);
af_pas = trapz(bAF_pas,pAF_pas);
razao_pas = bf_pas/af_pas;
bfnu_pas = bf_pas/(bf_pas+af_pas);
afnu_pas = af_pas/(bf_pas+af_pas);
total_pas = (mbf_pas+bf_pas+af_pas);
```

```
[ num2str('Dom. Freq. PAS'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('Pot mBF'),10,...
  num2str('Pot BF'),10,...
  num2str('Pot AF'),10,...
  num2str('BF/AF'),10,...
  num2str('BF nu'),10,...
  num2str('AF nu'),10,...
  num2str('Pot Total'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str(mbf_pas),10,...
  num2str(bf_pas),10,...
  num2str(af_pas),10,...
  num2str(razao_pas),10,...
  num2str(bfnu_pas),10,...
  num2str(afnu_pas),10,...
  num2str(total_pas),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('-----'),10 ]
```

```
% 13/04/2008 - Integração Espectro Cruzado:
```

```
bMBF_cr=FCr(1:21);
bBF_cr=FCr(22:82);
bAF_cr=FCr(83:308);
pMBF_cr=CxyCr(1:21);
pBF_cr=CxyCr(22:82);
pAF_cr=CxyCr(83:308);
```

```
mbf_cr = trapz(bMBF_cr,pMBF_cr);
bf_cr = trapz(bBF_cr,pBF_cr);
af_cr = trapz(bAF_cr,pAF_cr);
```

```
[ num2str('Pot. Cross'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('Pot mBF'),10,...
  num2str('Pot BF'),10,...
  num2str('Pot AF'),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str(mbf_cr),10,...
  num2str(bf_cr),10,...
  num2str(af_cr),10,...
  num2str(' '),10,...
  num2str('-----'),10 ]
```

Noninvasive Method for Electrocardiogram Recording in Conscious Rats: Feasibility for Heart Rate Variability Analysis

PEDRO P. PEREIRA-JUNIOR*, MOACIR MAROCOLO*, FABRÍCIO P. RODRIGUES,
EMILIANO MEDEI, JOSÉ H. M. NASCIMENTO

*These authors contributed equally to this work

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
CCS, Bloco G, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Key words: electrocardiography, heart rate variability, methodology, non-invasive, rat, unanesthetized.

Running title: NONINVASIVE ECG IN CONSCIOUS RATS: FEASIBILITY FOR HRV

Section: Biomedical and Medical Sciences

Correspondence to:

José Hamilton Matheus Nascimento, Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de Carvalho, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, CCS, Bloco G, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Tel.: +55-21-2562-6555; Fax: +55-21-2280-8193; E-mail: jhmn@biof.ufrj.br

ABSTRACT

Heart rate variability (HRV) analysis consists in a well-established tool for the assessment of cardiac autonomic control, both in humans and in animal models. Conventional methods for HRV analysis in rats rely on conscious state electrocardiogram (ECG) recording based on prior invasive surgical procedures for electrodes/transmitters implants. The aim of the present study was to test a noninvasive and inexpensive method for ECG recording in conscious rats, assessing its feasibility for HRV analysis. A custom-made elastic cotton jacket was developed to fit the rat's mean thoracic circumference, with two pieces of platinum electrodes attached on its inner surface, allowing ECG to be recorded noninvasively in conscious, restrained rats (n=6). Time- and frequency-domain HRV analyses were conducted, under basal and autonomic blockade conditions. High-quality ECG signals were obtained, being feasible for HRV analysis. As expected, mean RR interval was significantly decreased in the presence of atropine ($p<0.05$) and increased in the presence of propranolol ($p<0.001$). Also, reinforcing the reliability of the method, low- and high-frequency HRV spectral powers were, respectively, significantly decreased in the presence of propranolol ($p<0.05$) and atropine ($p<0.001$). In summary, the present work describes a novel, inexpensive and noninvasive method for surface ECG recording in conscious rats.

INTRODUCTION

The electrocardiogram (ECG) is a remarkably important tool for the study of cardiac electrophysiology, both in the clinical as in the experimental setting. It is known that the rat constitutes an important model for cardiovascular physiology research and, for long, ECG-based studies have been conducted in this animal model.

Heart rate variability (HRV) analysis, a technique that relies on the assessment of fluctuations on the intervals between successive ECG R waves, has been used as a powerful tool for assessment of cardiac autonomic control (Akselrod et al. 1981, Task Force 1996). Decreased HRV is associated with an increased risk for ventricular arrhythmia, and has been shown to constitute an independent prognostic factor for mortality in cardiac patients (Kleiger et al. 1987, Nolan et al. 1998). In rats, power spectral analysis of HRV has been shown to be an effective method of detecting disturbances in cardiac autonomic control in some experimental models of pathologic conditions, such as myocardial infarction and diabetic neuropathy (Krüger et al. 2000, Sanyal et al. 2002).

Approaches based on ECG recording in the anesthetized state lack validity for HRV analysis, since, under anesthesia, heart rate fluctuations related to cardiac autonomic modulation show marked impairment (Uechi et al. 1998, Mäenpää et al. 2007). Besides that, anesthesia may represent an important additional risk for animal mortality in some pathological conditions, such as in myocardial infarction and diabetes models (Tivesten et al. 2000, Flumignan et al. 2006, Cohen-Boulakia et al. 2000). Thus, the development of a new method that does not rely on surgical procedures for electrodes/transmitter implants may be of considerable importance.

Although telemetry represents the gold-standard for ECG recording in rats, the implementation of telemetric systems entails high costs. Additionally, some approaches based on

electrodes implants may be limited by progressive decreases in electrodes viability across a couple of days. So, the development and application of a noninvasive method for conscious state ECG recording may represent a consistent alternative approach, allowing long-term HRV studies in the rat model.

Thus, the aim of the present study was to test a noninvasive and inexpensive method for ECG recording in conscious rats, assessing its feasibility for heart rate variability analysis.

MATERIALS AND METHODS

The study was in accordance with the ‘‘Principles of laboratory animal care’’ (NIH publication No. 85-23, revised 1985), and was approved by the Institution’s Animal Care and Use Committee. Experiments were conducted on 6 male Wistar rats (330-370g), housed in cages floored with wood shavings, in a room with constant temperature (23°C) and 12h dark-light cycle. All animals had access to food and water *ad libitum*.

Prior to ECG recordings, animals were conditioned for 7 consecutive days, 20 minutes each day, inside a plexiglass restrainer. All posterior recordings were conducted on a constant environment, during the morning (0700-0900h).

A day before ECG was firstly recorded, the ventral thoracic region of each animal was carefully shaved. A custom-made elastic cotton jacket was developed to fit the rat’s mean thoracic circumference, and two pieces of rectangular platinum electrodes (each one measuring 7.0 x 3.0 mm) were attached on the jacket’s inner surface, with each electrode being connected to a cable long enough to reach the acquisition system. Electrodes were spatially disposed in such a way that direct contact to the animal’s skin was possible, allowing the ECG to be acquired

in a lead close to DII, with prominent R wave peaks. Details on the jacket can be observed in Figure 1B.

A conductive ECG gel was applied over each electrode, with care being taken to avoid the establishment of a gel bridge between them. After that, the elastic cotton jacket was dressed (Figure 1A), the animal was placed inside the plexiglass restrainer (Figure 1C), which had holes on its front end and on its other surfaces, allowing adequate ventilation, and electrodes were connected to a differential A/C amplifier (A-M Systems, USA), with signals being digitized by a 16 bit A/D interface converter (Axon 1322-A, USA), and sampled at 10 KHz by the software Axoscope 9.0 (Axon Instruments, USA). Data were stored in a PC for off-line processing. The ECG recording started 10 minutes after animal was placed inside the plexiglass restrainer, and was conducted for 5 minutes. For each record, the most stable 180s continuous segment was chosen for HRV analysis. This segment duration was described in previous studies (Mangin et al. 1998, Krüger et al. 2000).

Additional records were conducted on different days (48h interval between them), with animals under vagal and sympathetic blockade conditions. For vagal blockade assessment, animals were treated with the muscarinic antagonist atropine sulfate (2 mg kg^{-1} i.p., Sigma), while for sympathetic blockade, the beta blocker DL-propranolol hydrochloride was used (4 mg kg^{-1} i.p., Sigma). Electrocardiogram records were carried out 10 minutes after drug injection.

All HRV signal processing in the present study was done using Matlab-based algorithms. ECGs were bandpass filtered (2-300 Hz) and, after R wave peak detection, 180-s tachograms were generated, containing all heart period fluctuations within this time segment. In the time-domain, the following indexes were obtained: RR (mean RR interval), SDNN (standard

deviation of RR intervals), RMSSD (square root of the mean squared differences of successive RR intervals), and pNN5 [percentage of successive RR interval differences greater than 5 ms, as described by Aubert and colleagues (1999)]. For spectral (frequency-domain) analysis of HRV, tachograms were resampled to equal intervals by spline cubic interpolation method at 10 Hz, and the linear trend was removed. Power spectrum was obtained with a fast Fourier transform based method (Welch's periodogram: 256 points, 50% overlap, and Hamming window). Two frequency bands were determined: low-frequency (LF: 0.2–0.8 Hz), and high-frequency (HF: 0.8–2.5 Hz). Power (in ms^2) was estimated as the area under the spectrum within these frequency ranges.

Paired Student's t-tests were conducted in order to compare power spectral indexes (LF and HF powers) before and after autonomic blockades, while mean RR comparisons were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test. All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.). Statistical significance was established at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

Electrocardiography in conscious state animals is a widely used tool for cardiac autonomic control, allowing the extraction of HRV parameters. With the present noninvasive method, we have shown the possibility of acquiring a high-quality ECG signal in non-anesthetized rats, as shown in Figure 2A, presenting an unfiltered ECG segment. As with conventional methods relying on surgical implants of electrodes/transmitters, we showed that the present approach is feasible for HRV analysis in the time- and frequency-domain, as illustrated in Figure 2B and Figure 2C, which show, respectively, a representative tachogram and RR power

spectrum. Additionally, in Table 1 we present the individual HRV time- and frequency-indexes from each of the 6 animals used in the present work.

In addition, to assess the HRV responses to autonomic blockades, atropine and propranolol were used. As expected, RR was significantly decreased in the presence of the muscarinic antagonist atropine sulfate (n=6; p<0.05), and increased in the presence of the beta-adrenergic antagonist propranolol (n=6; p<0.001), as shown in Figure 3A. Also, reinforcing the reliability of the present method, as expected, low-frequency HRV power was significantly decreased in the presence of propranolol (Figure 3B; p<0.05), and high-frequency HRV power was significantly decreased in the presence of atropine sulfate (Figure 3C; p<0.001).

DISCUSSION

Reduced heart rate variability (HRV) constitutes an independent prognostic factor for cardiac events (Tsuji et al. 1996). To date, evidence exists suggesting also a possible prognostic value of HRV in rodents (Rowan et al. 2007). The rat has been shown to constitute an important model for the study of HRV, being suitable for investigations involving diseases, toxicological, and environmental approaches (Krüger et al. 2000, Pereira-Junior et al. 2006, Rowan et al. 2007, Chang et al. 2007, Howarth et al. 2008). Besides that, the application of non-linear methods in the study of HRV in rats has been recently described (Beckers et al. 2006).

Conventional methods for conscious state ECG recording in rats rely on surgical procedures for electrodes/transmitter implants, which are generally conducted one or a few more days before records take place. Our previous experience has shown that inflammatory responses to implanted custom-made electrodes generally occur about a week after surgery, leading to

progressive worsening in the signal to noise ratio, even resulting in the complete absence of detectable ECG tracings after some days or weeks (data not shown). Long-term ECG recording has already been described with telemetric systems (Howarth et al. 2008). Nevertheless, to our knowledge, no previous report describes long-term ECG recordings using setups based on custom-made implanted electrodes and direct cable connection. Thus, the present method may represent an interesting and inexpensive alternative to telemetry, allowing ECG repeated measures to be taken across a given time period, which may benefit study designs such as the ones used to assess the time course of complications in cardiovascular disease models, drug therapies, or cardiovascular adaptations to exercise training. Besides that, if adequate safety precautions are taken in animal handling, using a noninvasive method may possibly represent a way of reducing the risk of accidental infection, compared to surgical methods, in cases where conscious state ECG recording is necessary in rat models of infectious diseases (eg, Chagas' Disease).

Animal restraining may represent a potential limitation of our method, as no free activity or grooming was possible. Thus, we can not discard the hypothesis that restraining related stress could have some interference on the HRV indexes obtained. Nevertheless, some studies conducted on freely moving Wistar rats presented mean RR values comparable to ours for control animals (Lo Giudice et al. 2002). In the spectrum shown in Figure 2C, it is possible to notice the presence of a low-frequency spectral peak occurring at about 0.3 Hz, and a high-frequency peak close to 1.5 Hz, this spectral profile being comparable to those presented in previous HRV characterization and validation studies, which were conducted in freely moving rats, and relied on surgical procedures for cable-based data acquisition or telemetric data transmission (Kuwahara et al. 1994, Aubert et al. 1999). Moreover, the normalized LF and HF

values obtained in this study are in agreement with previous findings in unrestrained conscious rats with implanted telemeters (Mangin et al. 1998, Ning et al. 2006). Thus, it seems important to remark that previous habituation to the procedure (see Methods) may be a very important requirement for optimizing this noninvasive approach.

Previous works have described blood pressure measurement in conscious rats, allowing the determination of blood pressure variability and baroreflex sensitivity (Ramaekers et al. 2002). We should remark that the present method is only suited for measurement of ECG, and is not valid if blood pressure recording is also needed.

Another potential limitation of the present method may be due to its potential interference over the rat's respiratory pattern, so we took care to ensure that the custom-made jacket was complacent, in order to minimize this potential issue. In this way it is important to remark that the intra-group sample dispersion of HF power values are in agree with previous data published by the authors, using implanted electrodes (Pereira-Junior et al. 2006). Besides that, the responses of HRV spectral indexes to sympathetic and parasympathetic autonomic blockades have shown a similar physiological pattern comparable with previous works in the literature that used telemetric systems (Kuwahara et al. 1994). We should remark that this approach may be specially suited for repeated ECG measures, so that paired comparisons would not be affected by such methodological concerns.

In summary, the present work describes a novel, inexpensive and noninvasive method for surface ECG recording in conscious, restrained rats, which represents a feasible approach for HRV analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). PPPJ holds a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) consiste em uma metodologia bem estabelecida para o estudo do controle autonômico cardíaco, tanto em humanos como em modelos animais. As metodologias convencionais para o estudo da VFC em ratos utilizam-se de procedimentos cirúrgicos para o implante de eletrodos ou transmissores, o que possibilita a posterior aquisição do eletrocardiograma (ECG) no estado consciente. O objetivo do presente trabalho foi o de desenvolver e aplicar um método não-invasivo para o registro do ECG em ratos conscientes, verificando sua validade para a análise da VFC. Uma vestimenta de tecido elástico em algodão foi desenvolvida de acordo com as dimensões médias da circunferência torácica dos animais, e dois pequenos eletrodos retangulares de platina foram aderidos à superfície interna da vestimenta, permitindo o registro do ECG de forma não-invasiva em ratos conscientes (n=6), sob contenção. Foram conduzidas análises de VFC nos domínios do tempo e da frequência, tanto para a condição basal, como para as condições de bloqueio autonômico. Foram obtidos sinais de ECG de alta qualidade, viáveis para a análise de VFC. Conforme esperado, o intervalo RR médio foi significativamente reduzido na presença de atropina ($p < 0.05$), e aumentado na presença de propranolol ($p < 0.001$). Reforçando a validade do método, as potências espectrais de baixa e alta frequência da VFC sofreram reduções significativas, respectivamente, na presença de propranolol ($p < 0.05$) e atropina ($p < 0.05$). Em resumo, o presente trabalho descreve um novo

método, de baixo custo e natureza não-invasiva, para a realização do ECG de superfície em ratos conscientes.

Palavras-chave: eletrocardiograma, método não-invasivo, ratos conscientes, variabilidade da frequência cardíaca, VFC.

REFERENCES

AKSELROD S, GORDON D, UBEL FA, SHANNON DC, BERGER AC AND COHEN RJ. 1981. Power spectrum analysis of heart-rate fluctuation – A quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213: 220-222.

AUBERT AE, RAMAEKERS D, BECKERS F, BREEM R, DENEFF C, VAN DE WERF F AND ECTOR H. 1999. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed* 60: 197-213,

BECKERS F, VERHEYDEN B, RAMAEKERS D, SWYNGHEDAUW B AND AUBERT AE. 2006. Effects of autonomic blockade on non-linear cardiovascular variability indices in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 431-439.

CHANG CC, HWANG JS, CHAN CC AND CHENG TJ. 2007. Interaction effects of ultrafine carbon black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats. *Environ Health Perspect* 115: 1012-1017.

COHEN-BOULAKIA F, VALENSI PE, BOULAHDOUR H, LESTRADE R, DUFOUR-LAMARTINIE JF, HORT-LEGRAND C AND BEHAR A. 2000. In vivo sequential study of skeletal muscle capillary permeability in diabetic rats: Effect of anthocyanosides. *Metabolism* 49: 880-885.

FLUMIGNAN RL, KANASHIRO RM, SARAIVA RM, PORTES LA, ANTONIO EL, ISHIGAI MM AND TUCCI PJ. 2006. Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously. *Braz J Med Biol Res* 39: 1323-1328.

HOWARTH FC, JACOBSON M, SHAFIULLAH M AND ADEGHATE E. 2008. Long-term effects of type 2 diabetes mellitus on heart rhythm in the Goto-Kakizaki rat. *Exp Physiol* 93: 362-369.

KLEIGER RE, MILLER JP, BIGGER JT JR AND MOSS AJ. 1987. Decreased heart-rate-variability and its association with increased mortality after acute myocardial-infarction. *Am J Cardiol* 59: 256-262.

KRÜGER C, LANDERER V, ZUGCK C, EHMKE H, KÜBLER W AND HAASS M. 2000. The bradycardic agent zatebradine enhances baroreflex sensitivity and heart rate variability in rats early after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 45: 900-912.

KUWAHARA M, YAYOU K, ISHII K, HASHIMOTO S, TSUBONE H AND SUGANO S. 1994. Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *J Electrocardiol* 27: 333-337.

LO GIUDICE P, CAREDDU A, MAGNI G, QUAGLIATA T, PACIFICI L AND CARMINATI P. 2002. Autonomic neuropathy in streptozotocin diabetic rats: effect of acetyl-L-carnitine. *Diabetes Res Clin Pract* 56: 173-180.

MÄENPÄÄ M, PENTTILÄ J, LAITIO T, KAISTI K, KUUSELA T, HINKKA S AND SCHEININ H. 2007. The effects of surgical levels of sevoflurane and propofol anaesthesia on heart rate variability. *Eur J Anaesthesiol* 24: 626-633.

NING G, BAI Y, YAN W, ZHENG X. 2006. Investigation of beat-to-beat cardiovascular activity of rats by radio telemetry. *Clin Hemorheol Microcirc* 34: 363-371.

MANGIN L, SWYNGHEDAUW B, BENIS A, THIBAUT N, LEREBOURS G AND CARRÉ F. 1998. Relationships between heart rate and heart rate variability: study in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 601-607.

NOLAN J et al. 1998. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure - Results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-Heart). *Circulation* 98: 1510-1516.

PEREIRA-JUNIOR PP, CHAVES EA, COSTA-E-SOUSA RH, MASUDA MO, DE CARVALHO AC AND NASCIMENTO JH. 2006. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol* 96: 487-494.

RAMAEKERS D, BECKERS F, DEMEULEMEESTER H AND AUBERT AE. 2002. Cardiovascular autonomic function in conscious rats: a novel approach to facilitate stationary conditions. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 7: 307-318.

ROWAN WH 3rd, CAMPEN MJ, WICHERS LB AND WATKINSON WP. 2007. Heart rate variability in rodents: uses and caveats in toxicological studies. *Cardiovasc Toxicol* 7: 28-51.

SANYAL SN, ARITA M AND ONO K. 2002. Inhomogeneous derangement of cardiac autonomic nerve control in diabetic rats. *Circ J* 66: 283-288.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. 1996. Heart rate variability - Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 93: 1043-1065.

TIVESTEN A, BOLLANO E, CAIDAHN K, KUJACIC V, SUN XY, HEDNER T, HJALMARSON A, BENGTSSON BA AND ISGAARD J. 2000. The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 141: 60-66.

TSUJI H, LARSON MG, VENDITTI FJ JR, MANDERS ES, EVANS JC, FELDMAN CL AND LEVY D. 1996. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events - The Framingham Heart Study. *Circulation* 94: 2850-2855.

UECHI M et al. 1998. Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G(s alpha). *Circ Res* 82: 416-423.

Table 1 - Individual HRV parameters

| Animal # | RR (ms) | SDNN (ms) | RMSSD (ms) | pNN5 (%) | LF Power (ms²) | HF Power (ms²) | LF/HF |
|-----------------|----------------|------------------|-------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| 1 | 153.54 | 9.89 | 5.41 | 24.40 | 14.74 | 11.30 | 1.30 |
| 2 | 149.48 | 6.23 | 3.47 | 13.72 | 3.37 | 4.33 | 0.78 |
| 3 | 147.78 | 8.40 | 4.47 | 20.79 | 9.93 | 6.69 | 1.48 |
| 4 | 153.65 | 5.85 | 4.64 | 27.81 | 5.83 | 8.71 | 0.67 |
| 5 | 147.88 | 7.78 | 2.95 | 2.71 | 5.65 | 3.30 | 1.71 |
| 6 | 146.97 | 4.94 | 3.23 | 12.83 | 4.72 | 3.19 | 1.48 |
| Mean | 149.88 | 7.18 | 4.03 | 17.04 | 7.37 | 6.26 | 1.24 |
| S.E.M | 1.21 | 0.75 | 0.39 | 3.74 | 1.72 | 1.34 | 0.17 |

RR (mean RR interval), SDNN (standard deviation of RR intervals), RMSSD (square root of the mean squared differences of successive RR intervals), pNN5 (percentage of successive RR interval differences greater than 5 ms), LF/HF ratio.

Figure Legends

Fig. 1 - ECG acquisition method: A - jacket placement on the rat. B - schematic diagram of the inner face of the jacket, illustrating negative and positive electrodes positions. LAL – left anterior limb; RAL – right anterior limb. C - restrained animal in rest during signal acquisition.

Fig. 2 - HRV graphs extracted from one animal: A – Non-filtered ECG segment tracing. B – Tachogram. C – Power spectrum of RR fluctuations.

Fig. 3 - Autonomic blockade data: A – Mean RR values under basal conditions and after atropine (2 mg kg^{-1}) or propranolol (4 mg kg^{-1}) blockade. B – Low-frequency spectral power under basal conditions and after propranolol blockade. C – High-frequency spectral power under basal conditions and after atropine blockade. Data expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. basal; ** $p < 0.001$ vs. basal; # $p < 0.001$ vs. atropine. For all conditions, $n = 6$.

Figure 1

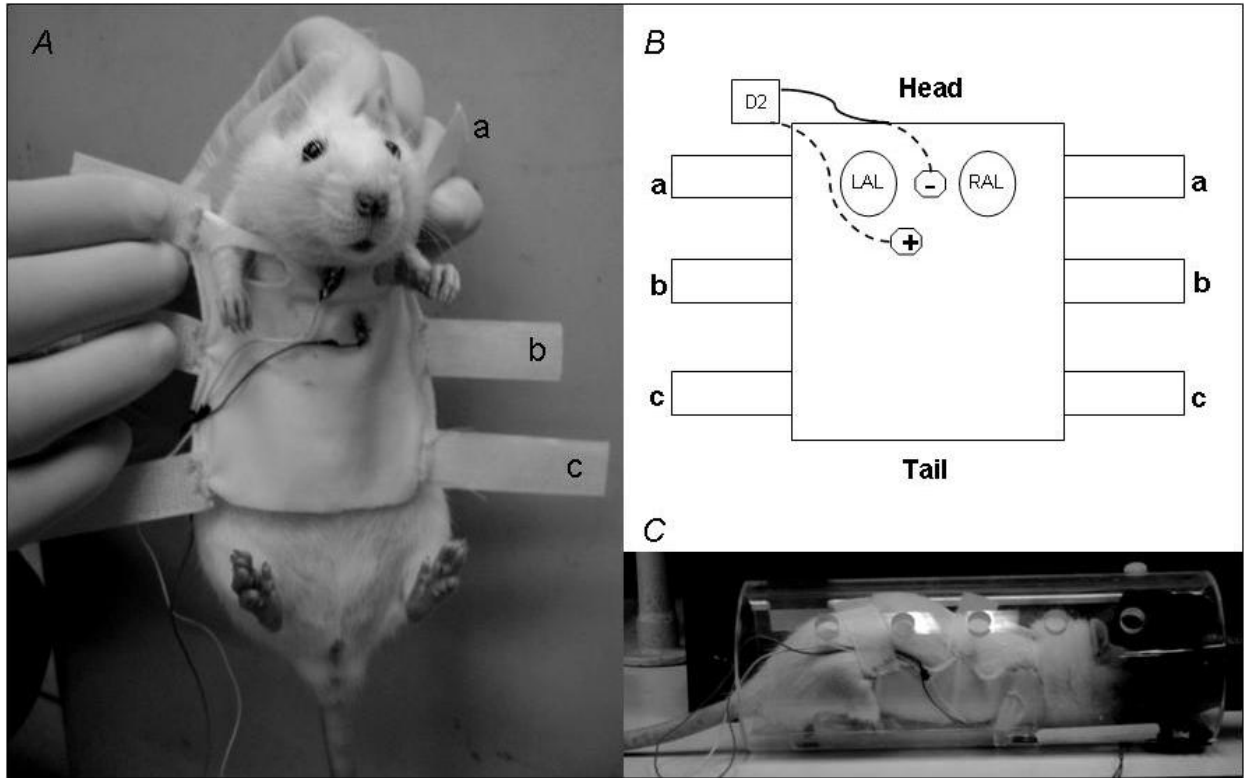


Figure 2

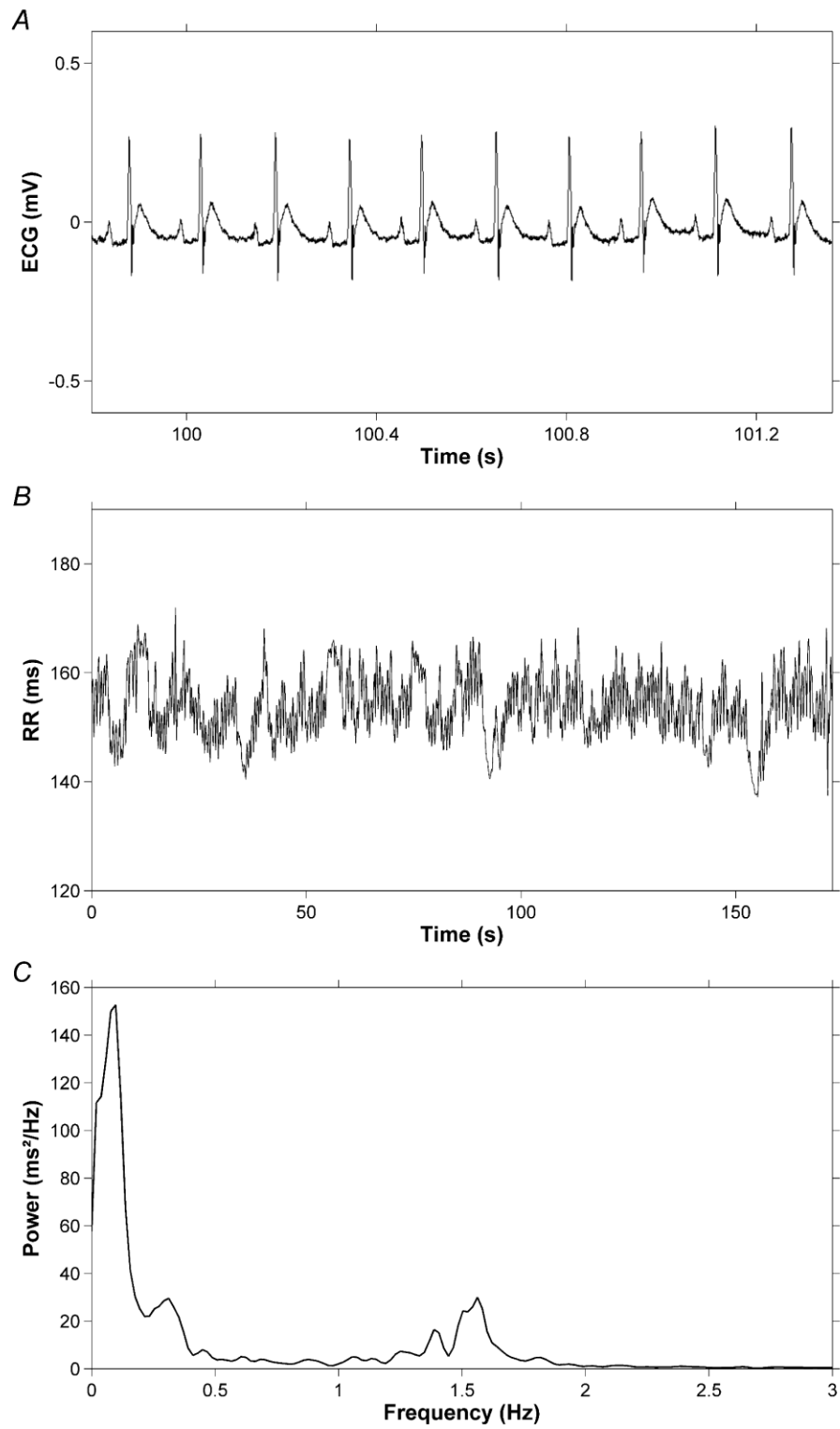
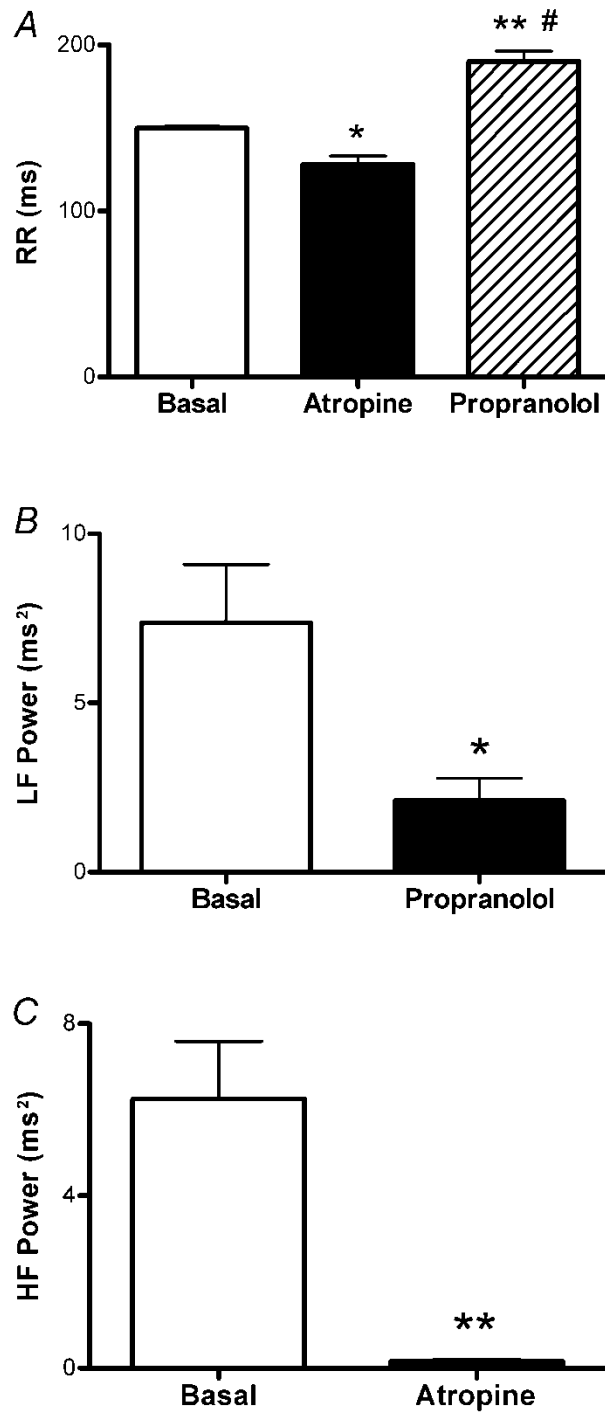


Figure 3



ORIGINAL ARTICLE

Pedro P. Pereira-Junior · Elen A. Chaves
Ricardo H. Costa-e-Sousa · Masako O. Masuda
Antonio C. Campos de Carvalho
José H. M. Nascimento

Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid

Accepted: 17 November 2005 / Published online: 13 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract To date no published data exist regarding the effects of chronic high-dose anabolic-androgenic steroid administration on tonic cardiac autonomic control. The aim of this study was to evaluate, by power spectral analysis of heart rate variability (HRV), the effects of chronic treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate (DECA) on tonic cardiac autonomic regulation in sedentary rats. Male Wistar rats were treated weekly with 10 mg kg⁻¹ of DECA ($n=7$) or vehicle (CONTROL, $n=7$) for 10 weeks. At the 8th week of treatment, electrocardiogram was recorded in the conscious state, for time- and frequency-domain HRV analysis. Parasympathetic indexes were reduced in DECA group: high-frequency power (CONTROL = 11.1 ± 3.0 ms² vs. DECA = 3.8 ± 0.6 ms², $P < 0.05$), RMSSD (CONTROL = 5.9 ± 0.9 ms vs. DECA 3.5 ± 0.3 ms; $P < 0.05$) and pNN5 (CONTROL = 31.5 ± 7.5 ms vs. DECA = 13.2 ± 2.6 ms; $P < 0.05$). The sympathetic index LF/HF tended to be higher in DECA group (CONTROL = 0.65 ± 0.15 vs. DECA = 1.17 ± 0.26 , $P = 0.0546$). In conclusion, chronic treatment with DECA, in rats, impairs tonic cardiac autonomic regulation, which may provide a key mechanism for anabolic steroid-induced arrhythmia and sudden cardiac death.

Keywords Heart rate variability · Spectral analysis · Autonomic nervous system · Anabolic-androgenic steroid · Nandrolone decanoate

Introduction

Anabolic-androgenic steroids (AAS) are synthetic testosterone derivatives developed to maximize anabolic and minimize androgenic action (Strauss and Yesalis 1991; Schänzer 1996), being used in the clinical setting to treat catabolic conditions such as osteoporosis and renal failure (Strauss and Yesalis 1991; Pavlatos et al. 2001).

Although various side effects secondary to high-dose AAS consumption are reported, illicit AAS abuse is widespread among young athletes and non-athletes aiming to optimize strength and muscle mass gain (Kennedy and Lawrence 1993; Dickerman et al. 1995; NIDA 2000), being nandrolone decanoate (DECA) one of the most frequently consumed AAS among this population (NIDA 2000). AAS abuse has become an issue of public health (Payne et al. 2004) and, in the last years, special attention has been given to its role in the development of cardiovascular abnormalities, with published data pointing to the occurrence of hypertension, heart failure, cardiomyopathy, arrhythmia and sudden cardiac death (Kennedy and Lawrence 1993; Sullivan et al. 1998; Fineschi et al. 2001).

Heart rate variability (HRV) analysis has been used as a powerful tool for assessment of cardiac autonomic control (Akselrod et al. 1981; Task Force 1996; Cohen and Taylor 2002). Cardiac vagal impairment, detected by reduced high-frequency (HF) power in spectral analysis of HRV, is a marker of cardiac electrical instability, and has been shown to constitute an independent prognostic factor for ventricular arrhythmia and sudden cardiac death in cardiac patients (Tsuji et al. 1996; Bigger et al. 1992; Kleiger et al. 1987; Routledge et al. 2002). In rats, power spectral analysis of HRV has been shown to be an effective method of detecting disturbances in cardiac autonomic control in some experi-

P. P. Pereira-Junior · E. A. Chaves · M. O. Masuda
J. H. M. Nascimento (✉)
Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antonio Paes de
Carvalho, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
UFRJ, CCS, Bloco G, Ilha do Fundão,
21949-900 Rio de Janeiro RJ, Brazil
E-mail: jhmn@biof.ufrj.br
Tel.: +55-21-25626555
Fax: +55-21-22808193

R. H. Costa-e-Sousa · A. C. C. de Carvalho
Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
UFRJ, CCS, Bloco G, Ilha do Fundão,
21949-900 Rio de Janeiro RJ, Brazil

mental models of pathologic conditions, such as myocardial infarction and diabetic neuropathy (Krüger et al. 2000; Sanyal et al. 2002).

Despite the prevailing association between AAS abuse, ventricular arrhythmia and sudden cardiac death, to date no published data exist regarding the effects of chronic administration of supraphysiological doses of AAS on tonic cardiac autonomic control.

Vascular and structural changes within ventricular myocardium are postulated as the most plausible mechanism that could account for arrhythmogenesis and sudden cardiac death in this population (McNutt et al. 1988; Kennedy and Lawrence 1993; Dickerman et al. 1995). Nevertheless, a more clear understanding of the mechanisms of heart diseases associated to AAS abuse is needed (Payne et al. 2004). Few animal model studies have been conducted in order to evaluate the impact of AAS supraphysiological doses on the cardiovascular system, and human studies still fail to clearly establish a direct cause–effect relationship between AAS abuse and sudden cardiac death (Kennedy and Lawrence 1993; Fineschi et al. 2001).

The aim of this study was to evaluate, by power spectral analysis of HRV, the effects of chronic treatment with supraphysiological doses of DECA on tonic cardiac autonomic regulation in sedentary rats.

Methods

Experimental animals

The study was in accordance with the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1985), and was approved by the Institution’s Animal Care and Use Committee. Experiments were conducted on 14 male Wistar rats, housed in individual cages floored with wood shavings, in a room with constant temperature (23°C) and 12-h light–dark cycle (lights on at 07:00 h). All animals had access to food and water ad libitum. The animals were divided into two groups: DECA ($n=7$), which were treated weekly with 10 mg kg⁻¹ body weight of DECA (Deca Durabolin®, Organon Inc.) and CONTROL ($n=7$) which were treated weekly with the vehicle for the drug (peanut oil with benzyl alcohol, 90:10, v/v). The dose of DECA used in this study was based on the studies of Trifunovic et al. (1995) and Woodiwiss et al. (2000). DECA and VEHCLE were administered by a single injection in the gluteus medium muscle once a week for 10 weeks.

Biometrics measures

Body weights of animals were determined weekly. At the end of AAS treatment period, the animals were etherized and sacrificed by cervical dislocation. The hearts were removed to determine heart weight. The heart weight/

body weight ratio was used as an index of cardiac hypertrophy.

Electrocardiogram recording

By the start of the 8th week, rats were anesthetized (ketamine/xylazine: 80/20 mg kg⁻¹, i.p.), and by a surgical procedure two steel electrodes were implanted subcutaneously near to the apex and base of the heart. Electrodes were exteriorized through the back of the neck and terminated in a custom-made connector. Electrocardiogram (ECG) recordings in the conscious state were started 72 h after surgical procedure, being conducted while unrestricted animals rested quietly in individual cages, without walking inside it. Records were always started 15 min after linking the connector, through flexible cables, to the data acquisition system (3A9 amplifier, Tektronix/TL-2 A/D Interface, Axon Instruments), and were conducted, in all animals, for 3 min and 10 s (these additional 10 s were recorded to ensure 180 s of artifact-free tachograms, nevertheless, when RR edition was conducted, it never reached over 1% of detected intervals). ECG signals were acquired with the sampling rate of 10-kHz and amplitude resolution of 12 bits. In order to reduce the effect of heart rate circadian fluctuations, all records were conducted in a constant environment, at the same period of the day (13:00–15:00 h). Forty-eight hours after basal ECG recording, 10 of the 14 animals (CONTROL $n=5$; DECA $n=5$) were treated with the muscarinic antagonist atropine sulfate (2 mg kg⁻¹ i.p.) and new ECG records were carried out.

Heart rate variability

All HRV signals processing in the present study was done using Matlab-based algorithms. After R wave peak detection, 180-s tachograms were generated, containing all heart period fluctuations within this time segment. In the time-domain, the following indexes were obtained: RR (mean RR interval), SDNN (standard deviation of RR intervals), RMSSD (square root of the mean squared differences of successive RR intervals) and pNN5 [percentage of successive RR interval differences greater than 5 ms (Aubert et al. 1999)]. For spectral (frequency-domain) analysis of HRV, tachograms were resampled to equal intervals by spline cubic interpolation method at 10 Hz, and the linear trend was removed. Power spectrum was obtained with a fast Fourier transform based method (Welch’s periodogram: 256 points, 50% overlap, and Hamming window). Two frequency bands were determined: low frequency (LF: 0.2–0.8 Hz), and high frequency (HF: 0.8–2.5 Hz). Power (in ms²) was estimated as the area under the spectrum within these frequency ranges. Muscarinic blockade data were expressed as percent reductions in HF power after atropine sulfate administration.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.). Comparisons between groups were carried out by Student's unpaired *t* test. A paired *t* test was conducted to compare HF power values prior to and post-atropine administration. Welch's correction was applied when variances were significantly different between groups. For body weight comparisons, two-way analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Bonferroni's multiple comparison post-test. Statistical significance was established at the $P < 0.05$ level.

Results

Effects of AAS treatment on body and heart weight

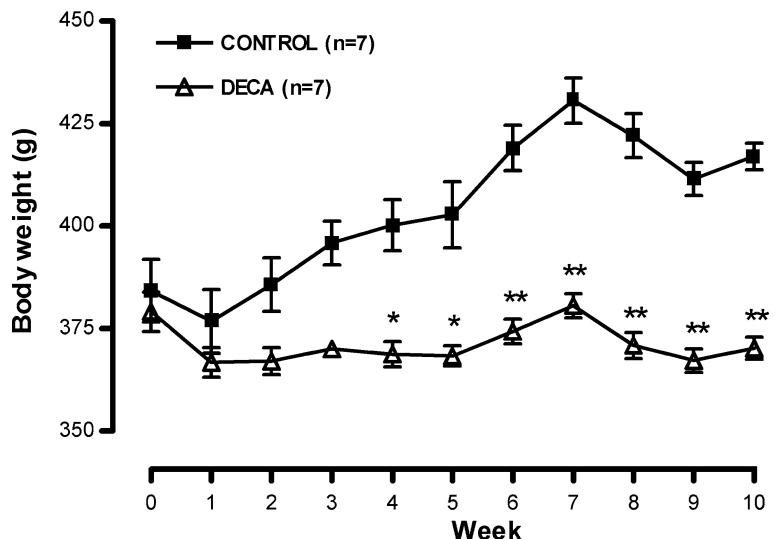
The effect of AAS treatment on body weight of rats is illustrated in Fig. 1. There was no significant difference between the initial body weights of both groups. DECA impaired the growth of rats, so statistical difference in mean body weight between the two groups occurred from the 4th week to the end of treatment.

The final heart weight was not different between groups when compared in absolute values, but was significantly increased in the animals treated with supraphysiological doses of AAS when expressed in relation to final body weight (Table 1).

Effects of AAS treatment on time-domain measures of HRV in conscious rats

Figure 2 shows time-domain HRV indexes for CONTROL and DECA groups. No significant differences between groups were observed for RR and for SDNN.

Fig. 1 Body weight (g) across 10-week treatment with nandrolone decanoate (DECA) or vehicle (CONTROL). Week 0 represents basal condition prior to the start of the treatment period. Data expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ versus CONTROL



The time-domain indexes of parasympathetic modulation RMSSD and pNN5 were significantly lower in DECA group ($P < 0.05$).

Effects of AAS on frequency-domain measures of HRV in conscious rats

Figure 3 shows representative ECG tracings and full-length tachograms and HRV power spectra for a CONTROL (a, c, e) and a DECA (b, d, f) rat. A lower HF variability may be visually detected in the DECA rat tachogram, and so is expressed in its associated power spectrum, where the HF peak is virtually absent. The mean values for frequency-domain indexes of HRV are shown in Fig. 4. The HF power density was significantly lower in the DECA group (CONTROL = $11.1 \pm 3.0 \text{ ms}^2$ vs. DECA = $3.8 \pm 0.6 \text{ ms}^2$, $P < 0.05$). The ratio between low-frequency (LF) and HF power tended to be higher in the DECA group (CONTROL = 0.65 ± 0.15 vs. DECA = 1.17 ± 0.26), with a *P* value close to statistical significance ($P = 0.0546$). Muscarinic blockade with atropine led to a marked HF power decrease in both groups, compared to basal condition ($P < 0.05$). In the comparison between groups, similar percent reduction in HF power was found in both groups, with no statistical difference among them (CONTROL = $96.0 \pm 2.0 \%$ vs. DECA = $97.6 \pm 0.7 \%$).

Discussion

The results of the present study show for the first time that chronic administration of high doses of AAS leads to dysfunction in tonic cardiac autonomic regulation. Although it is clear that caution should be applied when extrapolating animal model data to human physiology, we believe that the present study may provide further insight on the cardiac impact of high-dose AAS adminis-

Table 1 Effects of supraphysiological doses of nandrolone decanoate (DECA) on body and heart weights of rats

| | Body weight (g) | | Final heart weight | |
|---------------|-----------------|---------------|--------------------|--------------------------------|
| | Initial | Final | Absolute (g) | Relative (mg g ⁻¹) |
| CONTROL (n=7) | 384.1 ± 7.7 | 417.0 ± 3.2 | 1.31 ± 0.04 | 3.15 ± 0.10 |
| DECA (n=7) | 379.1 ± 4.8 | 370.1 ± 2.7** | 1.31 ± 0.02 | 3.53 ± 0.06* |

Data expressed as mean ± SEM. Relative final heart weight: ratio of absolute final heart weight to final body weight

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, versus CONTROL

tration, suggesting an alternative mechanism for anabolic steroid-induced arrhythmia and sudden cardiac death.

Nandrolone Decanoate was the AAS applied in the present work. The weekly DECA dose of our treatment protocol is equal to that used in previous works on the cardiovascular impact of AAS in rats, being equivalent to doses frequently applied by human abusers (Trifunovic et al. 1995; Norton et al. 2000). Our data corroborate the well-known AAS-induced effect on body weight gain of rats. Similarly as shown by Trifunovic et al. (1995), Joumaa and Léoty (2001), Lindblom et al. (2003) and Takahashi et al. (2004), the chronic treatment with supraphysiological doses of DECA decreased the body weight gain of the treated animals, compared to control animals. This effect became evident after 4 weeks of treatment and could not be attributed to the lipolytic stimulatory effect of AAS, since in a parallel

study in our laboratory we have found no reduction in the peritoneal fat mass of sedentary rats treated with nandrolone, compared to untreated sedentary rats. A reduction of food intake as cause of decreased growth have been excluded by Trifunovic et al. (1995), since they have failed to show a reduction in food intake or a decreased gastrointestinal energy absorption in the AAS-treated animals. These findings disagree with Lindblom et al. (2003), who observed AAS-induced inhibition of food intake and decrease in abdominal fat mass which could be mediated by alterations in the melanocortin system, since they have found evidences of increased α -melanocyte-stimulating hormone levels in the AAS-treated group.

It is known that power spectral analysis of HRV constitutes a powerful tool for quantitative and qualitative cardiac autonomic regulation assessment.

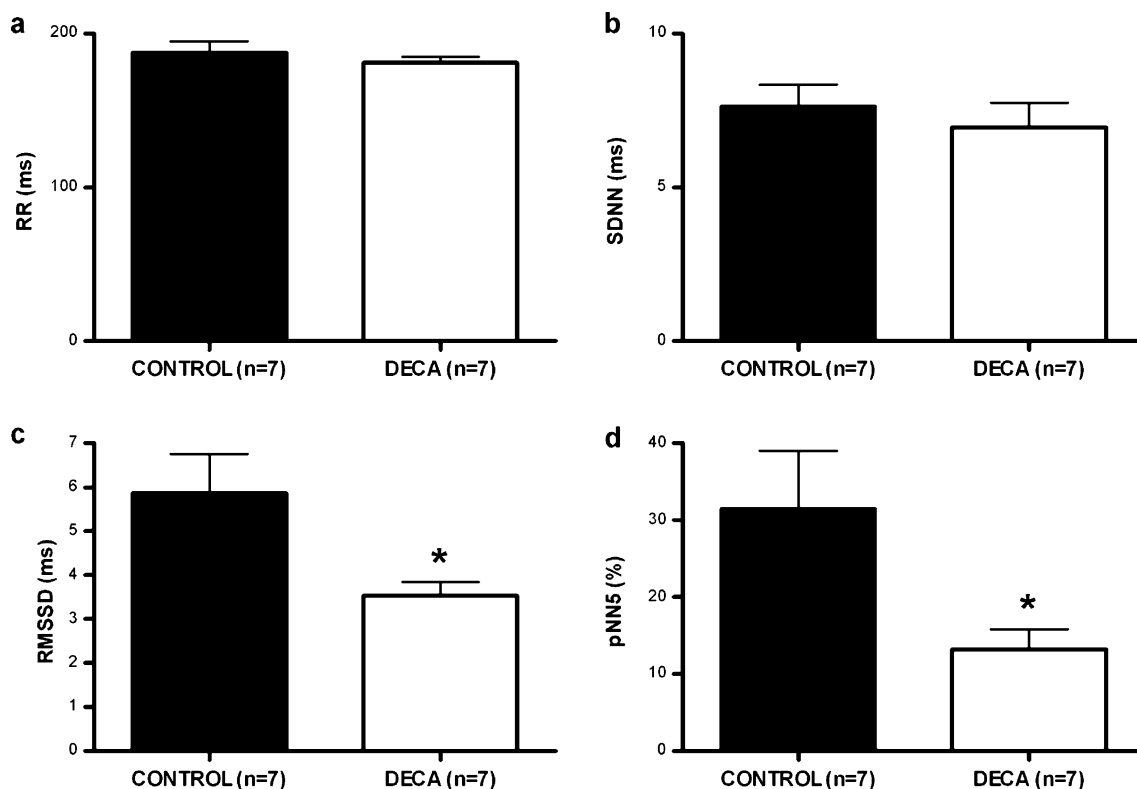
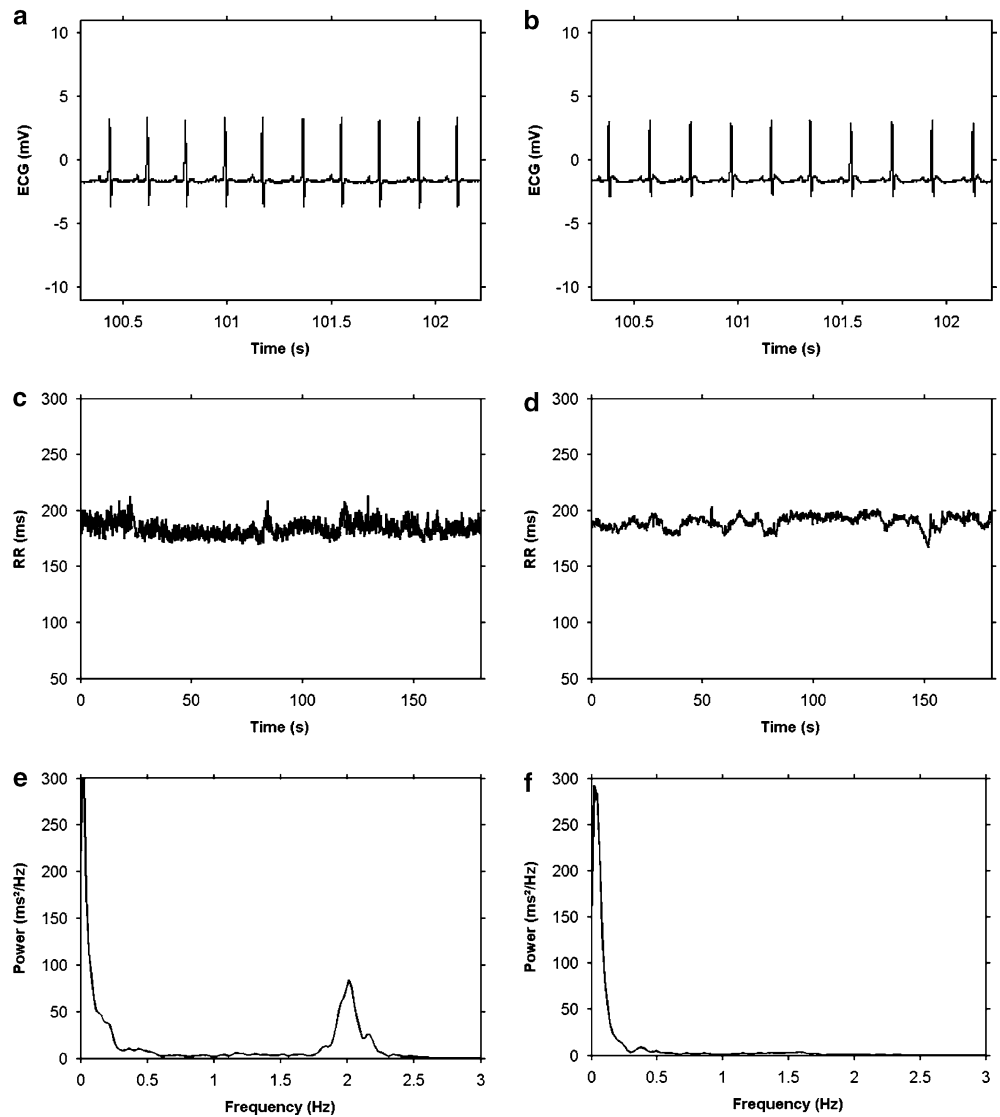


Fig. 2 Effects of supraphysiological doses of DECA on time-domain HRV indexes. RR [mean RR interval (a)], SDNN [standard deviation of RR intervals (b)], RMSSD [square root of

the mean squared differences of successive RR intervals (c)], pNN5 [percentage of successive RR interval differences greater than 5 ms (d)]. Data expressed as mean ± SEM. * $P < 0.05$

Fig. 3 Representative ECG tracing, tachogram and power spectrum from a CONTROL (a, c, e) and a DECA animal (b, d, f)



Recently, a validation study of HRV analysis in rats has been published (Aubert et al. 1999). Other reports have shown that altered HRV patterns in rats are consistent with those presented in human studies for well-established cardiac autonomic dysfunction conditions, such as diabetes mellitus and myocardial infarction (Krüger et al. 2000; Sanyal et al. 2002), which are associated with ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. As in these pathological conditions, our group of rats treated with AAS presented a marked impairment of parasympathetic cardiac modulation with decreased HF power of HRV compared to the control group. In the AAS group, time-domain parasympathetic indexes RMSSD and pNN5 (Aubert et al. 1999; El-Mas MM and Abdel-Rahman 2004) were also reduced, which corroborates the parasympathetic cardiac dysfunction shown by spectral analysis. Muscarinic blockade data reinforce the role of parasympathetic modulation over HF power, confirming the reliability of our HRV analysis methodology (Ramaekers et al. 2002a).

The body of evidence supporting a direct cause-effect relationship between AAS abuse, ventricular arrhythmia and sudden cardiac death has not yet been clearly established, and not much is known about the possible mechanisms responsible for arrhythmogenesis in AAS abusers. Studies on the cardiovascular impact of chronic AAS administration consist mainly of case reports with few animal models available. In one of these animal-model-based studies, it has been shown that chronic treatment with AAS reduces markedly the life span of male mice (Bronson and Matherne 1997), mortality being assumed to occur mainly by liver and kidney damage, with cardiac involvement representing a secondary cause. In humans a 12-year longitudinal study comparing a group of body builders who abused of AAS to an age matched control group, constituted by general population individuals, indicated a 4.6 higher mortality in the former group, with cardiovascular damage pointed as the cause of death in 37.5 % of these individuals (Parssinen et al. 2000).

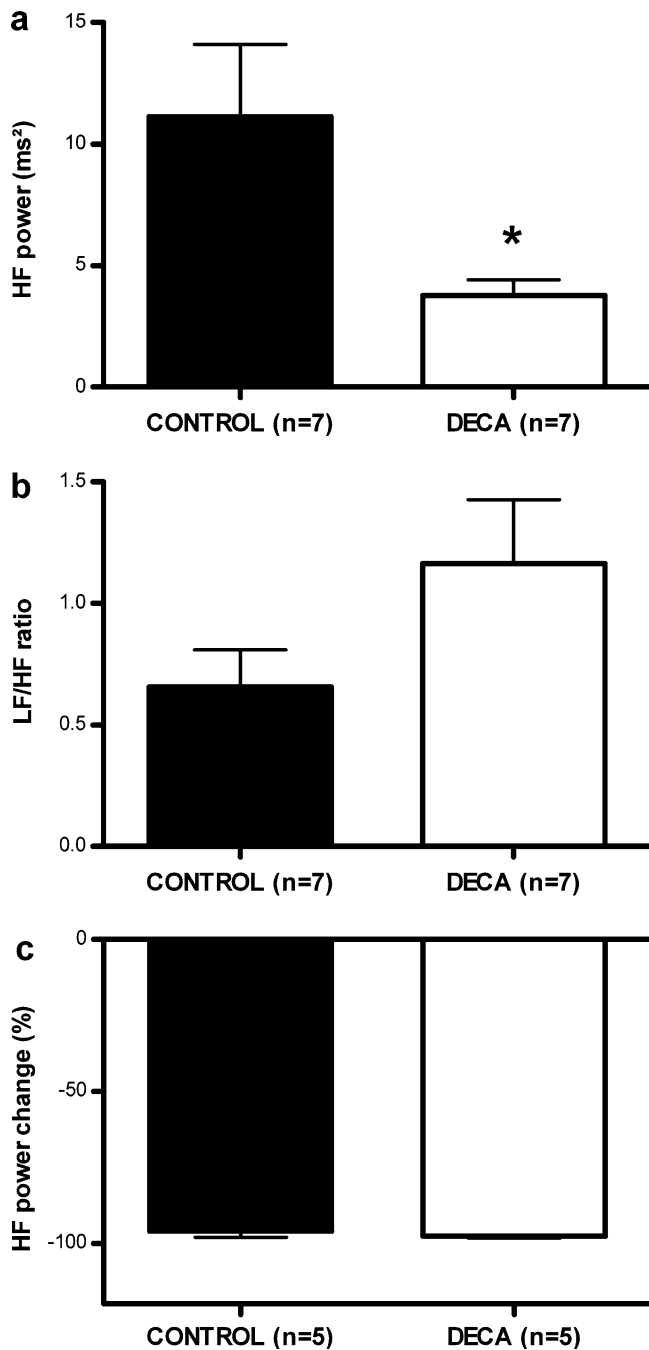


Fig. 4 Effects of supraphysiological doses of DECA on spectral HRV indexes. HF power (a), LF/HF ratio (b), and percent reduction in HF power after muscarinic blockade (c). Data expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$

It has been proposed that alterations in myocardial architecture, with myofibril derangement and establishment of fibrosis, would be responsible for atrioventricular conduction abnormalities and for the generation of ventricular reentry circuits, which would lead to ventricular arrhythmia and sudden cardiac death, in highly trained AAS abusers (Kennedy and Lawrence 1993;

Sullivan et al. 1998; Fineschi et al. 2001). Nevertheless, in human longitudinal studies, the possibility of pre-existing cardiomyopathy, independent of AAS abuse, cannot be completely discarded (Maron 1997). Vascular alterations are also possible co-factors, with atherosclerosis, coronary occlusion and vasospasm occurrence (McNutt et al. 1988; Ferenchick et al. 1992; Dickerman et al. 1995). Previous studies also point out to heart failure as a long-term cardiac side effect of AAS abuse in athletes, which could represent a main factor leading to cardiac death in this population (Dickerman et al. 1995; Sullivan et al. 1998). It seems that in strength-trained subjects, AAS abuse impairs diastolic function, a fact that is supported by some echocardiographic studies (Pearson et al. 1986; De Piccoli et al. 1991; Urhausen et al. 2004) but not all (Thompson et al. 1992). In the present study, the final heart weight of the AAS-treated animals was not different from control group. However, the final heart weight/body weight ratio increased with the AAS treatment. At the 8th week of treatment, we have also assessed cardiac function by means of echocardiography (data not shown), but our results have not indicated any differences in systolic or diastolic properties between the two groups. An in vitro study by Liang et al. (1993), conducted in rats, has shown that AAS impairs endurance training capacity to improve cardiac contractile performance, nevertheless, they have shown no AAS effect among sedentary rats, which is in accordance to our results. Norton et al. (2000), who also conducted in vitro study in sedentary rats, showed impaired contractile properties in AAS-treated group only when hearts were stimulated by isoproterenol, but not without this intervention. LeGros et al. (2000) found reduced contractility and compliance in AAS-treated rats, but besides applying a different AAS (17 α -methyltestosterone), 2–3 times higher doses of the steroid were used, in comparison to the present work. Norton et al. (2000) also found diastolic alterations, nevertheless, although applying the same weekly dose of DECA than ours (10 mg kg⁻¹), cardiac function was assessed after an approximate 13 weeks of treatment, while in the present work it was assessed at the 8th week. Thus, it seems plausible that autonomic dysfunction constitutes an early sign of AAS-induced cardiac disease which, per se, represents a pro-arrhythmogenic factor that could occur independently, or preceding functional and/or structural abnormalities.

Previous works suggest that AAS chronic administration may induce a profile of increased responsiveness to catecholamines (McNutt 1988; Kennedy and Lawrence 1993). Although not in a statistically significant fashion, our HRV power spectral analysis results indicated a trend to sympathetic overactivation, as the sympathetic modulation index LF/HF (Sanyal and Ono 2002) was increased in the DECA group compared to the CONTROL group.

One possible explanation to AAS-induced autonomic imbalance raises from its effect on central nervous system, since DECA treatment influences several neuro-

transmitter systems, including dopaminergic, serotonergic and adrenergic (Thiblin et al. 1999; Schlussman et al. 2000; Kindlundh et al. 2003; Lindblom et al. 2003; Tamaki et al. 2003; Kindlundh et al. 2004). It is of special interest to detach the work of Tamaki et al. (2003), who demonstrated that nandrolone enhances both norepinephrine and its metabolite 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol levels in hypothalamus. Moreover, increased hypothalamic norepinephrine turnover is associated to an increase in systemic arterial pressure (reviewed in De Wardener 2001) and to a systemic hyperadrenergic state (Ishac et al. 1987). As previously cited, it has been proposed that high-dose AAS administration could increase α -melanocyte-stimulating hormone levels (Lindblom et al. 2003). Thus, an involvement of melanocortin system in AAS-induced autonomic changes may also be suggested, since it has been shown that central administration of melanocortins, in rats, can elicit increases in blood pressure and LF power of blood pressure variability, indicating increased sympathetic activity (Ramaekers et al. 2002b). It is known that sympathetic and vagal influences counteract in a manner that a sympathetic hyperactivation state could lead to a decrease in vagal cardiac control or vice versa (Levy 1971). Moreover, in a recent work Hamson et al. (2004) have shown the presence of androgen receptors in nucleus ambiguus, a brain center related to cardiac vagal control. This way, the existence of some kind of direct androgen-mediated vagal effect on cardiac autonomic regulation can also be hypothesized. Nevertheless, it is clear that further research needs to be conducted in order to evaluate the possible mechanisms involved in androgen central effects on cardiac autonomic regulation.

Several potential limitations of the present study should be addressed. Concomitantly to HRV assessment of autonomic function, it would have been of interest to assess the impact of the AAS treatment protocol that we applied, on hemodynamic variables, such as blood pressure and total peripheral resistance. It is also not clear whether the AAS treatment applied had direct effects on respiratory rate or tidal volume, which could possibly affect HRV parasympathetic indexes. Possible changes in free-running rhythmicity (e.g., in baroreflex), could also account for alterations in measured indexes of HRV. It is important to remark that the present study was conducted in an animal model of sedentary rats, and that, to our knowledge, no human study has assessed this issue on sedentary individuals but, in contrast, generally on highly strength trained subjects. Thus, some of the results found by us may consist of model-specific responses that could possibly not be reproducible in humans. Besides assessing how exercise training would modulate autonomic effect of AAS, in the present model, it is clear that future research is also needed in order to assess cardiac autonomic regulation in human AAS abusers.

In summary, the results of the present study show, for the first time, that chronic high-dose AAS administration leads to dysfunction in tonic cardiac autonomic regulation, with marked impairment of parasympathetic control, which may provide a key mechanism for AAS-induced arrhythmia and sudden cardiac death. In addition, autonomic dysfunction seems to occur independently, or to precede any changes in cardiac systolic or diastolic function.

Acknowledgements PPPJ was recipient of a CNPq scholarship, and this work is part of his MSc manuscript.

References

- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ (1981). Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213:220–222
- Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F, Breem R, Denef C, Van De Werf F, Ector H (1999) The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed* 60:197–213
- Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN (1992) Frequency-domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 85:164–171
- Bronson FH, Matherne CM (1997) Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. *Med Sci Sports Exerc* 29:615–619
- Cohen MA, Taylor JA (2002) Short-term cardiovascular oscillations in man: measuring and modelling the physiologies. *J Physiol* 542:669–683
- De Piccoli B, Giada F, Benettin A, Sartori F, Piccolo E (1991) Anabolic steroid use in body builders: an echocardiographic study of left ventricle morphology and function. *Int J Sports Med* 12:408–412
- De Wardener HE (2001) The hypothalamus and hypertension. *Physiol Rev* 81:1599–1658
- Dickerman RD, Schaller F, Prather I, McConathy WJ (1995) Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology* 86:172–173
- El-Mas MM, Abdel-Rahman AA (2004) Differential modulation by estrogen of α 2-adrenergic and I1-imidazoline receptor-mediated hypotension in female rats. *J Appl Physiol* 97:1237–1244
- Ferenchick GS, Adelman S (1992) Myocardial infarction associated with anabolic steroid use in a previously healthy 37-year-old weight lifter. *Am Heart J* 124:507–508
- Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci Reattelli L, Turillazzi E (2001) Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch Pathol Lab Med* 125:253–255
- Hamson DK, Jones BA, Watson NV (2004) Distribution of androgen receptor immunoreactivity in the brainstem of male rats. *Neuroscience* 127:797–803
- Ishac EJ, Eskay R, Hirata F, Axelrod J, Kunos G (1987) Adrenergic regulation of beta-endorphin secretion from anterior pituitary in conscious rats: effects of thyroid state. *Endocrinology* 120:1073–1078
- Joumaa WH, Léoty C (2001) Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscles. *Med Sci Sports Exerc* 33:397–403
- Kennedy MC, Lawrence C (1993) Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust* 158:346–348
- Kindlundh AMS, Lindblom J, Bergström L, Nyberg F (2003) The anabolic-androgenic steroid nandrolone induces alteration in the density of serotonergic 5HT_{1B} and 5HT₂ receptors in the male rat brain. *Neuroscience* 119:113–120

- Kindlundh AMS, Rahman S, Lindblom J, Nyberg F (2004) Increased dopamine transporter density in the male rat brain following chronic nandrolone decanoate administration. *Neurosci Lett* 356:131–134
- Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Moss AJ, The Multicenter Post-Infarction Research Group (1987) Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 59:256–262
- Krüger C, Landerer V, Zueck C, Ehmke H, Kubler W, Haass M (2000) The bradycardic agent zatebradine enhances baroreflex sensitivity and heart rate variability in rats early after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 45:900–912
- LeGros T, McConnell D, Murry T, Edavettal M, Racey-Burns LA, Shepherd RE, Burns AH (2000) The effects of 17 alpha-methyltestosterone on myocardial function in vitro. *Med Sci Sports Exerc* 32:897–903
- Levy MN (1971) Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ Res* 29:437–445
- Liang MTC, Paulson DJ, Kopp SJ, Glonek T, Meneses P, Gierke LW, Schwartz FN (1993) Effects of anabolic steroids and endurance exercise performance. *Int J Sports Med* 14:324–329
- Lindblom J, Kindlundh AMS, Nyberg F, Bergström L, Wikberg JES (2003) Anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate reduces hypothalamic proopiomelanocortin mRNA levels. *Brain Res* 986:139–147
- Maron BJ (1997) Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 350:127–133
- McNutt RA, Ferenchick GS, Kirilin PC, Hamlin NJ (1988) Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am J Cardiol* 62:164
- NIDA - National Institute on Drug Abuse. Research report series: Anabolic steroid abuse (2000) [Online]. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. <http://www.nida.nih.gov/PDF/RRSteroi.pdf> [14 Jul. 2004]
- Norton GR, Trifunovic B, Woodiwiss AJ (2000) Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *Eur J Appl Physiol* 81:310–316
- Parssinen M, Kujala U, Vartiainen E, Sarna S, Seppala T (2000) Increased premature mortality of competitive powerlifters suspected to have used anabolic agents. *Int J Sports Med* 21:225–227
- Pavlatos AM, Fultz O, Monberg MJ, Vootkur A (2001) Review of oxymetholone: a 17 α -alkylated anabolic-androgenic steroid. *Clin Ther* 23:789–801
- Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE (2004) Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart* 90:473–475
- Pearson AC, Schiff M, Mrosek D, Labovitz AJ, Williams GA (1986) Left ventricular diastolic function in weight lifters. *Am J Cardiol* 58:1254–1259
- Ramaekers D, Beckers F, Demeulemeester H, Aubert AE (2002a) Cardiovascular autonomic function in conscious rats: a novel approach to facilitate stationary conditions. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 7:307–318
- Ramaekers D, Beckers F, Demeulemeester H, Bert C, Deneff C, Aubert AE (2002b) Effects of melanocortins on cardiovascular regulation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:549–558
- Routledge HC, Chowdhary S, Townend JN (2002) Heart rate variability—a therapeutic target? *J Clin Pharm Ther* 27:85–92
- Sanyal SN, Ono K (2002) Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. *Pathophysiology* 8:197–203
- Sanyal SN, Arita M, Ono K (2002) Inhomogeneous derangement of cardiac autonomic nerve control in diabetic rats. *Circ J* 66:283–288
- Schänzer W (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* 42:1001–1020
- Schlussman SD, Zhou Y, Johansson P, Kiuru A, Ho A, Nyberg F, Kreek MJ (2000) Effects of the androgenic anabolic steroid, nandrolone decanoate, on adrenocorticotropin hormone, corticosterone and proopiomelanocortin, corticotrophin releasing factor (CRF) and CRF receptor1 mRNA levels in the hypothalamus, pituitary and amygdala of the rat. *Neurosci Lett* 284:190–194
- Strauss RH, Yesalis CE (1991) Anabolic steroids in the athlete. *Annu Rev Med* 42:449–457
- Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ (1998) The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis* 41:1–15
- Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T (2004) Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocr J* 51:425–434
- Tamaki T, Shiraishi T, Takeda H, Matsumiya T, Roy RR, Edgerton VR (2003) Nandrolone decanoate enhances hypothalamic biogenic amines in rats. *Med Sci Sports Exerc* 35:32–38
- Task Force of the European Society of Cardiology, the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93:1043–1065
- Thiblin I, Finn A, Ross SB, Stenfors C (1999) Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Br J Pharmacol* 126:1301–1306
- Thompson PD, Sadaniantz A, Cullinane EM, Bodziony KS, Catlin DH, Torek-Both G, Douglas PS (1992) Left ventricular function is not impaired in weight-lifters who use anabolic steroids. *J Am Coll Cardiol* 19:278–282
- Trifunovic B, Norton GR, Duffield MJ, Avraam P, Woodiwiss AJ (1995) An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. *Am J Physiol* 268:H1096–1105
- Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, Manders ES, Evans JC, Feldman CL, Levy D (1996) Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events—the Framingham heart study. *Circulation* 94:2850–2855
- Urhausen A, Albers T, Kinderman W (2004) Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart* 90:496–501
- Woodiwiss AJ, Trifunovic B, Philippides M, Norton GR (2000) Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. *J Appl Physiol* 88:409–415

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](#)