

FRANCIS RIBEIRO DE SOUZA

**Influência da funcionalidade do HDL-colesterol sobre o escore de
cálcio em usuários de esteroides androgênicos anabólicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Janieire de
Nazaré Nunes Alves

São Paulo

2019

FRANCIS RIBEIRO DE SOUZA

**Influência da funcionalidade do HDL-colesterol sobre o escore de
cálcio em usuários de esteroides androgênicos anabólicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Janieire de
Nazaré Nunes Alves

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Francis Ribeiro de
Influência da funcionalidade do HDL-colesterol
sobre o escore de cálcio em usuários de esteroides
androgênicos anabólicos / Francis Ribeiro de Souza. -
- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Maria Janieire de Nazaré Nunes
Alves.

Descritores: 1.Anabolizantes 2.Efluxo do
colesterol 3.HDL-colesterol 4.Doença da artéria
coronariana 5.Fluxo retrógrado 6.Sistema nervoso
simpático

USP/FM/DBD-233/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, meu “veinho” **Antonio Carlos de Souza** (o famoso Carapiá) e minha “mamis” **Elizabete Ribeiro de Souza**. Sem dúvida, o apoio de vocês foram a base para eu conseguir alcançar esse sonho. Se eu consegui chegar até aqui, foi porque vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis. O amor que sinto por vocês é imensurável.

Obrigado por estarem sempre ao meu lado, amo muito vocês!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus que foi a minha força divina e proteção de todos os dias durante minha caminhada. Agradeço a toda minha família, tios, tias, primos, primas e avós (em memória), por toda ajuda, incentivo e amor durante esses anos. À minha namorada Fabiana por todo amor, paciência, gestos de carinho e incentivo durante esses anos. Aos familiares da minha namorada por todo o apoio e incentivo.

À todos os voluntários que participaram desse estudo. A cooperação de vocês foi de grande importância para essa contribuição científica.

À minha orientadora e “mãe adotiva” em São Paulo, Doutora Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves (Janinha), por ter me acolhido na carreira acadêmica e pela confiança em mim depositada. Obrigado por todo aprendizado, pelas orientações e incentivos. Graças a senhora, eu tive a oportunidade de evoluir profissionalmente e pessoalmente, e como consequência, estou realizando um sonho. Nunca me esquecerei de você.

Ao meu grande amigo Marcelo Rodrigues dos Santos. Fico emocionado o quanto sou grato por toda ajuda durante estes anos. Sua paciência e ensinamentos me proporcionaram amadurecimento profissional e pessoal. Quando eu cheguei no grupo, eu era conhecido como um simples estagiário “caipira”, e tentava auxiliar os outros de alguma maneira, hoje em dia formamos uma equipe e te considero um irmão mais velho que a ciência me deu.

Ao meu grande amigo e professor de inglês nas horas vagas, Guilherme Fonseca (barba), pela força, incentivo e por me acompanhar em todos os exames. Ao meu amigo Rafael Armani (coach), por toda a ajuda na execução do projeto. A colaboração e a parceria de vocês foram fundamentais! Agradeço de coração!

Aos amigos de equipe, Kelly Correia (KellyKiii) e Antonio Battaglia, pela ajuda nos estudos e por estarem ao meu lado nestes anos. A minha amiga Aída Turquetto (amor em pessoa), por todo apoio e incentivo.

À Família Sayegh: Ana Luiza Sayegh, Vera Sayegh, Rubens Sayegh e Fabio Sayegh por toda colaboração e incentivo no início do projeto. O apoio dessa família foi fundamental para iniciar minha carreira como aluno de doutorado.

Aos colaboradores do projeto Prof. Mauricio Yonamine, Liliam Takayama e Profa. Rosa Maria, por todo o envolvimento e parceira durante o projeto. Agradecimento especial aos professores Dr. Carlos Eduardo Rochitte e Dra. Marisa Passarelli pela recepção, ajuda e todo incentivo durante esses anos. Agradeço também a minha amiga Lenira Cipriano, pela recepção e ajuda em todos os momentos.

Aos coautores dos artigos publicados pela parceria e ajuda na execução do projeto.

Às professoras, Dra. Maria Urbana Pinto Brandão Rondon e Dra. Ivani Credidio Trombetta, pela carinhosa recepção na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor (início do meu estágio em 2010), por toda atenção e pelo valioso aprendizado adquirido durante essa jornada. Agradeço a equipe multidisciplinar Eduardo Rondon (meu parceiro nos jogos de tênis), Newton Nunes (Néviton), Camila Paixão Jordão (Camilinha), Daniela Agostinho (minha parceira), Luciana Santos (atleta top), Ana Claudia (Jararaca), Renato Pelaquim (Parceiro) e Glauce Sanches (Glau) por me proporcionarem uma das maiores experiências profissionais como Profissional de Educação Física.

À equipe médica da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, Dra. Patrícia Oliveira (atleta, orientadora, professora e poliglota), Dra. Ana Maria Braga (estou as suas ordens no laboratório) e Dra. Fabiana Hodas

(sempre atenciosa) por todo aprendizado e companheirismo durante todos estes anos. Agradecimento especial ao meu grande amigo Dr. Marcel Costa (Dr. da Fiel), por todos os ensinamentos e jogos do Corinthians que fomos.

Aos amigos de laboratório, Allan Krusler (Alã ou AAlan), Patrícia Trevizan (Paty), Raphaela Groehs (Rapha), Adriana Sarmiento (Drii), Felipe Cepeda (Fêêlipi), Sara Rodrigues (Saritcha), Renan Guerra (Marreta), Thiago Goya (Tanaka), Igor Lucas (parceiro nas cervejas) e Yufuko (Japonesa que eu chama de Ioko). Aos amigos do “bandejão” Gustavo, Pedro e Bruno (são gente boa, mas se puder evitar é melhor). Foi muito bom conviver com todos vocês nestes anos. Obrigado por todo aprendizado e os momentos de descontração e risadas! Em especial aos amigos e professores, Daniel Martinez (falamos a letra “R” com gosto) e Larissa dos Santos (parceira nas cervejas), pela orientação durante o curso de aprimoramento, meus mais sinceros agradecimentos por toda experiência adquirida.

Às recepcionistas da Unidade Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, Mônica Marques (Moniquinha), Sandra Sino (Sandrovisk), Rosângela Aureliano (Rô Corinthians), Fabiana Pereira (Fabi Parmeira), Elaine e Petrick Noronha pelos momentos de descontração e ajuda institucional.

A equipe da secretaria da pós-graduação em cardiologia e comissão científica do InCor, Neuza Rodrigues, Juliana Lattari, Luana Guedes, Valdecira Ferreira, Monica Souto, Elaine Lagonegro, Fabiana Panham, Marcio e Klaus, pela paciência e por todas as ajudas durante esses anos.

Ao setor de angiotomografia de coronárias e ressonância magnética, Katia, Edilene, Sueli, médicos assistentes e equipe de enfermagem pelo apoio nos exames. As colaboradoras Renata do Val, Rute Ribeiro e Sandra Scaramuzzo pelo apoio na realização do protocolo.

Ao Diretor da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão, por me receber e pelo grande aprendizado científico.

Aos amigos que fiz durante a especialização em Reabilitação Cardiovascular (2012), Leticia, André, Everton e Gabriela, pelo incentivo e companheirismo!

Aos meus professores da graduação em especial Eduardo Morvan por indicar a Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor. Muito obrigado (“Pai Du” o que um telefone pode fazer?). Sem você jamais teria vivido tamanha experiência em minha vida.

Aos meus amigos e alunos da Academia Corpo & Movimento da cidade de Socorro - SP (minha cidade natal), por todo incentivo.

Aos meus queridos alunos de “*personal trainer*”, por todo apoio e incentivo durante todos esses anos.

A todos meus amigos que me acompanharam durante minha jornada e pelas novas amizades adquiridas em São Paulo. “Valeu galera!”

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro à pesquisa (projeto nº FAPESP 2012/10527-3 e Bolsa inicial de treinamento técnico nº 2014/12631-8).

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), ao Instituto do Coração (InCor) e à Fundação Zerbini pelo incrível aprimoramento que me proporcionaram.

Epígrafe

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:16

“If your dreams don’t scare you they’re not big enough”

Ellen Johnson Sirleaf

“Sonhar, Acreditar e Realizar”

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Apresentação de dissertações e teses sob forma de compilação de artigos, aprovado em 16 de setembro de 2011, pela Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Epígrafe

Normatização adotada

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1 Testosterona e sua ação fisiológica	1
1.2 Esteroides Androgênicos Anabólicos.....	3
1.3 Epidemiologia brasileira	5
1.4 Esteroides Androgênicos Anabólicos e Sistema Cardiovascular	6
2. Objetivos.....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1 Comissão de ética.....	11
3.2 População e critérios de inclusão	11
3.3 Coleta de dados	14
4. Análise Estatística.....	17
6. Resultados	18
6. Análise crítica.....	20
7. Conclusão	23
8. Referências bibliográficas.....	24
9. Artigos 1 e 2.....	33
Apêndice	

Resumo

Souza, FR. Influência da funcionalidade do HDL-colesterol sobre o escore de cálcio em usuários de Esteroides Androgênicos Anabólicos. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: O uso abusivo de esteroides androgênicos anabólicos (EAA) tem sido associado com doença arterial coronariana (DAC). Entretanto, os mecanismos envolvidos na DAC nessa população não estão totalmente esclarecidos. Os EAA levam a redução das concentrações da lipoproteína de alta densidade (HDL), a qual pode ser um dos fatores-chaves no processo aterosclerótico. Não apenas a concentração, mas também a funcionalidade da HDL está envolvida no processo da DAC. Entretanto, é desconhecido se usuários de EAA apresentam alteração na funcionalidade da HDL. Além disso, distúrbio no padrão de fluxo (*Shear Rate – SR*), caracterizado pelo aumento do fluxo retrogrado e oscilatório na artéria braquial, está associado com inflamação, aterosclerose, disfunção endotelial e hiperatividade do sistema nervoso simpático. Jovens não apresentam distúrbio no *SR*. Entretanto, idosos apresentam esse distúrbio o qual parece estar associada com hiperatividade simpática. Interessantemente, o abuso de EAA está associado com aumento da atividade nervosa simpática muscular (ANSM). No entanto, não é conhecido se jovens usuários de EAA apresentam distúrbio no *SR*. **Objetivos:** Avaliar a funcionalidade da HDL por meio do efluxo do colesterol e capacidade antioxidante, avaliar a presença de DAC em usuários de EAA; avaliar o comportamento do *SR* da artéria braquial com a associação da ANSM. Além disso, também avaliamos a proteína C reativa ultrasensível (PCR-us). **Métodos:** Vinte usuários de EAA (UEAA), 20 não usuários de EAA (ambos grupos praticantes de musculação) e 10 sedentários

controles (SC) pareados pela idade (29 ± 5 anos) foram avaliados nesse estudo transversal. A funcionalidade da HDL foi avaliada pelo efluxo do ^{14}C -colesterol e pela habilidade da HDL em atrasar a oxidação da LDL. A presença de DAC foi avaliada pela angiotomografia computadorizada. Além disso, avaliamos o SR da artéria braquial em um subgrupo de 10 usuários de EAA e 10 não usuários de EAA. Em repouso, SR retrógrado e oscilatório foram avaliados por meio de ultrassom, ANSM pela técnica de microneurografia e o PCR-us por exame de sangue. A dilatação do fluxo mediado (FMD) também foi avaliada. **Resultados:** O efluxo do colesterol foi menor no grupo UEAA comparado com os grupos NUEAA e CS (20 vs. 23 vs. 24%, respectivamente, $p < 0,001$). Entretanto, o tempo de atraso para oxidação da LDL foi maior no grupo UEAA comparado aos grupos NUEAA e CS (41 vs. 13 vs. 11 min, respectivamente, $p < 0,001$). Foram encontradas placas ateroscleróticas em pelo menos 2 artérias em 25% do grupo EAA. Por outro lado, nenhuma placa foi encontrada nos grupos NUEAA e CS. Encontramos uma correlação negativa com o tempo de uso de EAA e efluxo do colesterol. O grupo UEAA apresentou maior SR retrógrado ($24,42 \pm 17,25$ vs. $9,15 \pm 6,62 \text{ s}^{-1}$, $p = 0,01$) e oscilatório ($0,22 \pm 0,13$ vs. $0,09 \pm 0,07$ au $p = 0,01$) e ANSM (42 ± 9 vs 32 ± 4 disparos/100 batimentos, $p = 0,018$) comparado ao grupo NUEAA. Foi encontrada correlação positiva entre SR retrógrado e ANSM ($r = 0,50$, $p = 0,050$) e SR oscilatório e ANSM ($r = 0,51$, $p = 0,042$). O grupo UEAA apresentou elevação da PCR-us [$1,17 (0,44-3,63)$ vs $0,29 (0,17-0,70)$ mg/L, $p = 0,015$] e redução da FMD ($6,42 \pm 2,07$ vs. $8,28\% \pm 1,53\%$, $p = 0,035$) comparado ao grupo NUEAA. **Conclusão:** Nosso estudo indica que o abuso de EAA prejudica o efluxo do colesterol mediado pela HDL. O tempo de uso de EAA parece estar associado com menor efluxo do colesterol e DAC precoce nessa população. O EAA está associado com aumento do SR retrógrado e oscilatório o qual estão associados com aumento da ANSM. Além disso, o EAA parece causar inflamação

caracterizada pelo aumento da PCR-us. Todas essas alterações podem estar envolvidas no desenvolvimento de DAC precoce em jovens usuários de EAA.

Descritores: Anabolizantes; Efluxo do colesterol; HDL-colesterol; Doença da artéria coronariana; Fluxo retrógrado; Sistema nervoso simpático.

Abstract

Souza, FR. *Influence of HDL-cholesterol functionality on the calcium score in Androgenic Steroids Anabolic users*. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Background: Anabolic androgenic steroids (AAS) abuse have been associated with coronary artery disease (CAD). However, the mechanisms involved on CAD are unknown. AAS abuse leads to a remarkable decrease in high-density lipoprotein (HDL) plasma concentration, which could be a key factor in the atherosclerotic process. Moreover, not only the concentration of HDL, but also its functionality, plays a pivotal role in CAD. However, if AAS user have HDL functionality alterations its unknown. Furthermore, disturbed shear rate (SR), characterized by increased retrograde and oscillatory SR in the brachial artery, is associated with inflammation, atherosclerosis, endothelial dysfunction, and sympathetic hyperactivity. Young subjects do not have disturbed SR; however, elderly subjects do, which seems to be associated with sympathetic hyperactivity. Anabolic androgenic steroids (AAS) abuse in young is associated with increased muscle sympathetic nerve activity (MSNA). **Purpose:** We tested the functionality of HDL by cholesterol efflux and antioxidant capacity. We also evaluated the prevalence of CAD in AAS users. Moreover, we hypothesized that AAS users might have disturbed SR. We tested the association between retrograde and oscillatory SR with MSNA. In addition, we measured the high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). **Methods:** Twenty strength-trained AAS users (AASU) age 29 ± 5 yr, 20 age-matched strength-trained AAS nonusers (AASNU), and 10 sedentary controls (SC) were enrolled in this cross-sectional study. Functionality of HDL was evaluated by

14C-cholesterol efflux and the ability of HDL in inhibiting LDL oxidation. Coronary artery was evaluated with coronary computed tomography angiography. Furthermore, we evaluated a subgroup of 10 male AAS users, age 27 ± 4 years, and 10 age-matched AAS nonusers, age 29 ± 5 years. At rest, retrograde and oscillatory SR were evaluated by Doppler ultrasound, MSNA was measured with microneurography, and hs-CRP was measured in blood sample. Flow-mediated dilation (FMD) was also assessed. **Results:** Cholesterol efflux was lower in AASU compared with AASNU and SC (20 vs. 23 vs. 24%, respectively, $p < 0.001$). However, the lag time for LDL oxidation was higher in AASU compared with AASNU and SC (41 vs 13 vs 11 min, respectively, $p < 0.001$). We found at least 2 coronary arteries with plaques in 25% of AASU. None of the AASNU and SC had plaques. The time of AAS use was negatively associated with cholesterol efflux. AAS users had higher retrograde SR (24.42 ± 17.25 vs 9.15 ± 6.62 s⁻¹, $p = 0.01$), oscillatory SR (0.22 ± 0.13 vs 0.09 ± 0.07 au $p = 0.01$), and MSNA (42 ± 9 vs 32 ± 4 bursts/100 heart beats, $p = 0.018$) than nonusers. MSNA (bursts/100 heart beats) was correlated with retrograde SR ($r = 0.50$, $p = 0.050$) and oscillatory SR ($r = 0.51$, $p = 0.042$). AAS users had higher hs-CRP [1.17 (0.44-3.63) vs 0.29 (0.17-0.70) mg/L, $p = 0.015$] and decreased FMD (6.42 ± 2.07 vs $8.28\% \pm 1.53\%$, $p = 0.035$) than nonusers. **Conclusion:** This study indicates that AAS abuse impairs the cholesterol efflux mediated by HDL. Long-term AAS use seems to be correlated with lower cholesterol efflux and early subclinical CAD in this population. AAS abuse is associated with retrograde and oscillatory SR which were associated with augmented sympathetic outflow. In addition, AAS seems to lead to inflammation characterized by increased hs-CRP. These alterations may have the potential of increasing the early risk of atherosclerotic disease in young AAS users.

Descriptors: Anabolic agents; Cholesterol efflux; Cholesterol, HDL; Coronary artery disease; Retrograde flow; Sympathetic nervous system.

1. Introdução

1.1 Testosterona e sua ação fisiológica

A testosterona é o hormônio androgênico mais importante secretado pelas gônadas masculinas que possui duas funções no organismo: função androgênica (desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas), e função anabólica (desenvolvimento dos músculos esqueléticos e ossos) ¹. As células de Leydig, situadas no interstício do testículo maduro, produzem aproximadamente 95% da testosterona total, e outros 5% são produzidas pelas glândulas adrenais ¹. Um indivíduo adulto do sexo masculino produz de 5-10 miligramas (mg) de testosterona por dia, onde 98% está unida a duas proteínas: SHBG (globulina ligada a hormônios sexuais) e albumina. O restante, ou seja, 2% da testosterona se encontra na forma livre (testosterona livre).

A síntese da testosterona é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículos. O hipotálamo secreta pulsatilmente o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O FSH estimula as células de Sertoli para a produção de espermatozoides e o LH estimula as células de Leydig para a produção de testosterona. O aumento das concentrações de testosterona estimula o *feedback* negativo, sinalizando o hipotálamo e a hipófise anterior a reduzirem a liberação dos hormônios gonadotróficos. Por outro lado, quando as concentrações de testosterona estão reduzidos, o hipotálamo e a hipófise anterior passam a secretar seus respectivos hormônios para novamente, estimular a produção de testosterona ². (Figura 1)

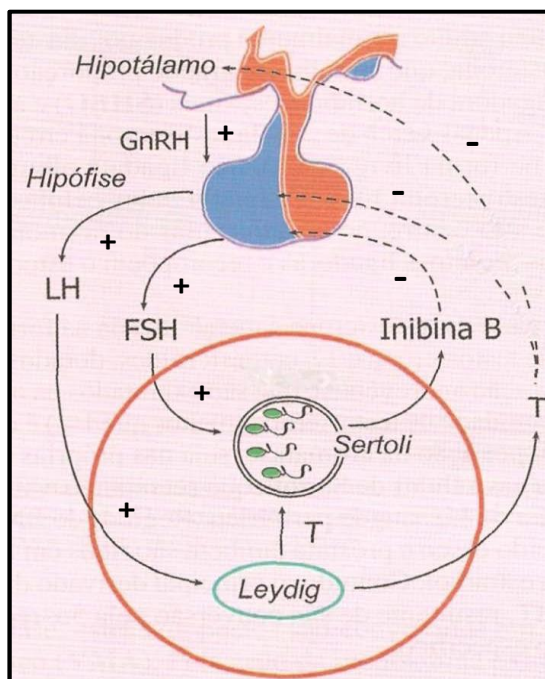


Figura 1. Síntese do hormônio testosterona regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículos. Feedback positivo (+) e feedback negativo (-). (Adaptado de Aires)²

A maior quantidade de testosterona produzida é convertida em di-hidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5-alfa-redutase, potencializando sua ligação ao receptor androgênico. No músculo esquelético, quando acontece a ligação do hormônio com o receptor, esse complexo migra para dentro do núcleo da célula e se liga a uma região promotora do DNA, onde irá promover crescimento e diferenciação celular, bem como o aumento da síntese proteica. Por outro lado, uma pequena quantidade de testosterona é convertida em estradiol pela ação da enzima aromatase, que por sua vez, irá se ligar ao receptor estrogênico¹. O estradiol é necessário para a deposição de tecido ósseo e também para a fusão epifisária ao final da puberdade³. (Figura 2)

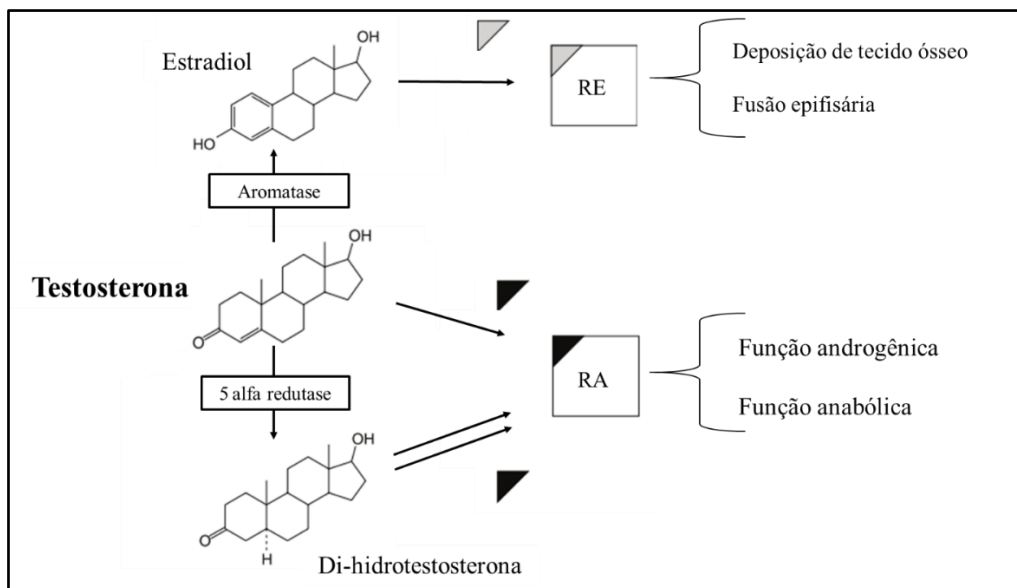


Figura 2. Conversão e ação da testosterona (Adaptado de Kicman) ¹

1.2 Esteroides Androgênicos Anabólicos

Os esteroides androgênicos anabólicos (EAA), conhecidos popularmente como “anabolizantes” são compostos sintéticos derivados da testosterona que possuem funções similares a testosterona endógena ⁴. Entretanto, durante o processo de sintetização dos EAA, algumas modificações estruturais são realizadas para aumentar a relação anabólica e reduzir seus efeitos androgênicos ¹.

Os EAA foram desenvolvidos para fins terapêuticos, como por exemplo no tratamento da deficiência na produção de testosterona (hipogonadismo) ⁵ e perda da massa muscular ⁶. Além disso, na década de 40, essas substâncias eram utilizadas no tratamento de doenças que acompanhavam o processo de envelhecimento masculino ⁷ como por exemplo as atrofias musculares ⁸. Por outro lado, durante a Segunda Guerra Mundial, os soldados alemães recebiam essas drogas não como fins terapêuticos, mas sim, com o objetivo de aumentar a agressividade nas batalhas ⁹.

O uso de substâncias com o intuito de melhorar o desempenho físico não é recente. A história mostra que há mais de 2.700 anos a.C. na China, lutadores e desportistas utilizavam uma planta local como estimulante para aumentar a agressividade nas disputas⁸. Relatos apontam que nos Jogos Olímpicos da Grécia, os atletas também utilizavam meios artificiais em busca de melhora no desempenho físico e muscular¹⁰.

Os EAA, por sua vez, têm seu primeiro registro na década de 1950, durante um campeonato de levantamento de peso realizado na cidade de Viena, capital da Áustria, onde alguns atletas russos apresentaram desempenho muito acima dos demais competidores⁸. A partir dos anos 60, os EAA começaram a se difundir na República Democrática Alemã. A República Democrática Alemã era um país relativamente obscuro, e os políticos do país imaginavam que o sucesso no esporte seria uma forma rápida para que o país fosse reconhecido e recebesse prestígio internacional. Dessa maneira, grandes investimentos foram realizados para aprimorar o desempenho atlético, e um deles foi o uso indiscriminado de fármacos ilegais. A partir de 1972 a pequena República Democrática Alemã começou a se destacar e permanecer constantemente no topo do *ranking* de medalhas, juntamente com os EUA e a ex-União Soviética. Nos anos seguintes, o uso de EAA difundiu-se não só na Alemanha, mas também em outros países do mundo¹¹.

Desde então, os EAA se disseminaram rapidamente entre as modalidades esportivas que exigiam força muscular. Como consequência, atletas amadores e praticantes de musculação conhecedores dos efeitos dos EAA na musculatura esquelética, começaram a utilizá-los para acelerar o processo de desenvolvimento muscular, ganho de força e aumento do desempenho físico, além de fins estéticos^{12, 13}. O uso abusivo dos EAA exerce um papel importante na ativação de genes celulares responsáveis em ativar vias moleculares de síntese proteica (hipertrofia muscular), como por exemplo, síntese

proteica de cadeia pesada de miosina (sigla em inglês - *MHC*) e da família da miogenina (sigla em inglês - *MyoD*), as quais são vias de sinalização para a hipertrofia muscular esquelética¹⁴. Além disso, os EAA também inibem vias de degradação de proteína, pela redução da via catabólica ubiquitina-proteassoma e ajudam na redução da gordura corporal, podendo agir diretamente no aumento da lipólise e diminuição de captação de lipídeos pelos adipócitos¹⁴.

1.3 Epidemiologia brasileira

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), estima-se que no Brasil em 2012, quase 1 milhão de pessoas (maiores de 18 anos) já usaram EAA, colocando os EAA em 8º lugar como droga mais consumida das 15 substâncias ilícitas listadas¹⁵. Andrade e colaboradores avaliaram a prevalência de drogas em mais de 12 mil universitários brasileiros e observaram que 3,8% dos entrevistados já usaram EAA pelo menos uma vez na vida¹⁶.

O uso indiscriminado dessas substâncias pode também ser encontrada entre profissionais de Educação Física¹⁷. Abrahin e colaboradores demonstraram que de 117 entrevistados (estudantes de Educação Física e formados), o uso de EAA foi prevalente em 31%. No mesmo trabalho, os autores relatam que quanto maior o grau de formação, maior foi a prevalência de uso dos EAA. Um relato interessante do estudo mostrou que 75% dos indivíduos utilizam essas substâncias por estética e 24,3% usavam como marketing profissional, principalmente para professores que atuam em academias. Isso pode ser atribuído pelo fato que alguns professores de academia acreditam que o seu corpo funciona como espécie de “currículo”, associando a boa forma corporal à qualidade profissional.

Por fim, a prevalência do uso de EAA no Brasil pode variar de 2,1 a 31,6% de acordo com a região. No entanto, mais estudos precisam ser realizados com estudantes e profissionais de Educação Física para saber mais sobre a prevalência. Isso se torna importante na medida que esses indivíduos são profissionais da área da saúde que podem aconselhar e influenciar na decisão sobre o uso dessas substâncias, principalmente em praticantes de atividade física ¹⁸.

Embora essas substâncias possam ter seus efeitos positivos no processo de hipertrofia do músculo esquelético e redução do percentual de gordura, diversas alterações prejudiciais no sistema cardiovascular e risco para a saúde vêm sendo associadas com o uso abusivo de anabolizantes.

1.4 Esteroides Androgênicos Anabólicos e Sistema Cardiovascular

Como descrito anteriormente, os EAA foram desenvolvidos para fins terapêuticos no tratamento de algumas doenças ¹⁹. Entretanto, nas últimas décadas, o uso indiscriminado dessas substâncias em busca de resultados mais rápidos, tornou-se um problema de saúde pública ^{4, 20}. O abuso de EAA para fins desportivos e estéticos pode levar a diversas alterações no sistema cardiovascular tais como; hipertrofia ventricular esquerda, alterações na função diastólica e aumento da resistência arterial periférica ^{4, 7}.

Tem sido estudado há mais de 15 anos por esse grupo, os efeitos do uso abusivo de anabolizantes no sistema cardiovascular em praticantes de musculação. Em um dos primeiros estudos publicados, foi demonstrado que o uso de EAA pode causar aumento da pressão arterial (PA) de 24 horas associado com maior elevação da atividade nervosa simpática (ASNM) em repouso, avaliado pela técnica de microneurografia ²¹. Além disso, recentemente Porello e colaboradores demonstraram que usuários de EAA, além de

apresentaram elevação da ANSM em repouso, também apresentam uma resposta exacerbada da ANSM durante uma situação de estresse, avaliado pelo “*stroop color word test*”, quando comparado aos não usuários²². Embora a causa da elevação da PA e da ANSM não estejam totalmente clara, foi observado em estudo experimental que alterações no controle barorreflexo arterial pode ser um dos mecanismos envolvidos nessa alteração²³. Recentemente, observamos em humanos menor sensibilidade barorreflexa e desbalanço do controle autonômico. Além disso, também foi encontrado maior rigidez arterial nos usuários de EAA comparados aos não usuários²⁴.

Além do prejuízo do sistema nervoso simpático, também foi observado prejuízo da resposta da atividade nervosa parassimpática, avaliada pela queda da frequência cardíaca de recuperação após teste de esforço máximo na esteira (teste cardiopulmonar). Usuários de EAA apresentaram menor resposta da queda da frequência cardíaca de recuperação do 1º e 2º quando comparado aos não usuários²⁵. Todas essas alterações em conjunto demonstram um desbalanço no controle autonômico, o que pode estar envolvido na elevação da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso em jovens usuários de EAA.

Há também a possibilidade que o aumento da PA esteja associado a sobrecarga hemodinâmica nos ventrículos, gerando inclusive alterações no remodelamento cardíaco²⁶. O aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo pode causar diminuição na função diastólica final e, com isto, levar a disfunção cardíaca tanto diastólica quanto sistólica²⁷⁻²⁹.

Registros de morte súbita, principalmente aquelas associadas ao infarto agudo do miocárdio (IAM), vem chamando atenção em jovens usuários de EAA. A primeira morte súbita que se tem conhecimento devido ao abuso de EAA foi em 1988³⁰. Em alguns estudos de caso, jovens usuários de EAA faleceram após parada cardíaca sem apresentar

sintomas prévios. Os estudos de necropsia revelaram hipertrofia, dilatação, fibrose intersticial, focos de necrose do ventrículo esquerdo e agregação plaquetária ³¹.

Alterações no perfil lipídico como concentrações reduzidas de HDL e aumento das concentrações de LDL, são frequentemente observados em usuários de EAA ^{21, 32}. Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pela maior atividade da enzima lipase triglicerídica hepática. No fígado, os EAA principalmente administrados por via oral, podem induzir ao aumento da atividade da lipase triglicerídica, favorecendo aumento das concentrações de LDL e redução das concentrações de HDL ^{33, 34}. Além disso, reduções da concentração de HDL também pode depender da dose e do tempo de uso de esteroides ³⁵. Dessa maneira, alguns investigadores têm sugerido que o IAM em usuários de EAA, pode estar associado com essas alterações lipoproteicas ³⁶.

A HDL é um dos principais fatores envolvidos no controle do processo aterosclerótico ³⁷. A função antiaterogênica da HDL é devido principalmente a sua função de transportar lípidos, principalmente ésteres de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, conhecido como transporte reverso do colesterol ³⁷. Além disso, a HDL possui outras funções importantes e protetoras no vaso sanguíneo como: proteger a LDL do processo de oxidação, estimular a síntese de óxido nítrico, inibir a síntese de fator de ativação plaquetária e proteger os eritrócitos contra a atividade pró-coagulante ^{38, 39}. Por outro lado, concentrações reduzidas de HDL estão fortemente associado com o desenvolvimento de DAC ³⁷.

Não apenas a concentração, mas também a funcionalidade da HDL tem um papel importante na prevenção de DAC ⁴⁰. Kosmas e colaboradores reportaram que a capacidade da HDL em remover o colesterol do macrófago é uma função importante da HDL, porque é associada inversamente com o risco de DAC, independente da concentração de HDL ⁴¹.

Santora e colaboradores foram os primeiros a demonstrarem em um estudo clínico observacional que usuários de EAA apresentam maior quantidade de cálcio nas artérias coronarianas ⁴². Recentemente, Baggish e colaboradores demonstraram que usuários de EAA [idade mediana de 42 anos (39-47)] apresentam DAC e maior volume de placa nas coronárias comparado a não usuários. Embora esse estudo não tenha estudado os mecanismos envolvidos nessa precoce alteração, foi observado que o volume de placa está associado com o tempo de uso dessas substâncias ⁴³. Dessa maneira, se torna necessário estudar os possíveis mecanismos envolvidos nessa doença, uma vez que, a presença de cálcio na artéria coronariana é um fator de risco independente para eventos cardiovasculares ^{44, 45}.

O comportamento do padrão de fluxo sanguíneo arterial, conhecido como “*Shear rate*” (SR), tem sido associado com desenvolvimento de DAC. O SR unidirecional (fluxo anterógrado) causa uma tensão de cisalhamento (*shear stress*) na parede endotelial que está associado a maior liberação de substâncias antiaterogênicas como por exemplo; óxido nítrico e superóxido dismutase, além do balanço vasomotor arterial que influencia a função endotelial ⁴⁶. Por outro lado, um distúrbio no SR, caracterizado pelo aumento do fluxo retrógrado e oscilatório, gera um *shear stress* que está associado a maior liberação de fatores pro-aterogênicos e aumento da disfunção endotelial ⁴⁶. O distúrbio do SR foi observado primeiramente em idosos, o qual parece estar associado com maior ANSM e menor biodisponibilidade de óxido nítrico ⁴⁷.

O aumento do SR retrogrado contribui na liberação de processos inflamatórios que estão associados ao desenvolvimento da doença aterosclerótica ⁴⁶. A proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), a qual é um marcador inflamatório associada com o aumento risco de evento cardiovascular na população geral ⁴⁸, foi observado, então, que em usuários de EAA, havia maior concentração da PCR-us comparado aos não usuários ⁴⁹.

Dessa maneira, é possível imaginar que usuários de EAA poderiam apresentar distúrbio no SR devido ao aumento da ANSM ^{21, 22}, maior inflamação vascular e consequente, aumento no processo aterosclerótico.

Dessa forma, as hipóteses desse estudo foram: 1) Além das concentrações plasmáticas reduzidas de HDL, usuários de EAA também apresentam prejuízo na funcionalidade da HDL; 2) Usuários de EAA apresentam maior escore de cálcio e DAC precoce e; 3) Usuários de EAA apresentam um distúrbio no SR (aumento do fluxo retrógrado e oscilatório) associado com o aumento da ANSM e PCR-us.

2. Objetivos

Objetivos Primários:

- 1) Avaliar a funcionalidade da HDL (efluxo do colesterol e capacidade antioxidante) em usuários de EAA;
- 2) Avaliar a presença de escore de cálcio e doença arterial coronariana precoce em usuários de EAA;

Objetivo Secundário.

- 1) Avaliar o comportamento do *Shear Rate* retrógrado e oscilatório da artéria braquial em usuários de EAA.

3. Material e Métodos

3.1 Comissão de ética

O presente projeto foi submetido à comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), e aprovado sobre número do parecer (3945/13/070).

3.2 População e critérios de inclusão

Os indivíduos foram pré-selecionados em diversas academias do Estado de São Paulo. Além disso, também acompanhamos algumas competições de fisiculturismo com o objetivo de selecionar voluntários. Por meio de visualização em redes sociais, e-mails também foram enviados para possíveis candidatos que visualmente pareciam utilizar os EAA.

Dessa maneira, no período de 2015 até 2017, foram entrevistados 68 indivíduos do sexo masculino. Destes, 18 foram excluídos por não apresentarem todos os critérios de inclusão ou por falta de tempo para participar do estudo. Dos aproximadamente 20 e-mails enviados, apenas 3 indivíduos responderam com interesse em participar, no entanto, não apresentavam os critérios de inclusão. Assim, 50 indivíduos foram separados em três grupos: 1) 20 indivíduos usuários de Esteroides Androgênicos Anabólicos (grupo UEAA) praticantes de musculação; 2) 20 indivíduos não usuários de Esteroides Androgênicos Anabólicos (grupo NUEAA) praticantes de musculação, e; 3) 10 indivíduos sedentários saudáveis, denominado controle sedentário (grupo CS).

O cálculo amostral foi projetado, após consulta com um profissional Estatístico especializado na área. O cálculo amostral foi realizado com base em um estudo da literatura ⁴², em que foi verificado o escore de cálcio em usuários de esteroides

anabolizantes. Nesse estudo, foi observado em um número de 14 indivíduos usuários de anabolizantes, 7 indivíduos apresentavam percentil de cálcio superior ao percentil 90, ou seja, 50% dos indivíduos. Além disso, nesse mesmo estudo, o grupo controle que foi pareado para a idade, dos 12 indivíduos avaliados, apenas 3 apresentavam um percentil de cálcio superior a 50, aproximadamente 12%. Então, baseado nesse estudo foi projetado o tamanho amostral da seguinte forma:

Teste de diferença(bilateral): $M2 <> M1$

m1	m2	d.p.	delta	alfa	z(alfa/2)	z(alfa)	beta	z(beta)	n(por grupo)
12	50	38	1,00	0,05	1,96	1,64	0,1	1,28	22
12	50	38	1,00	0,05	1,96	1,64	0,2	0,84	17

Onde: m1: 12% que é a taxa observada na população geral para a idade (literatura).

m2: 50% que é a taxa provável esperada de acometimento da população que será estudada.

Dessa forma, para uma diferença estatística com erro alfa de 5% e erro beta de 20%, o gradiente Delta é de 100% para 17 pacientes com um poder estatístico de 84%.

Para a participação do estudo, os indivíduos deveriam apresentar os seguintes critérios:

A) Critérios de inclusão para o grupo UEAA:

- ✓ Homens com idade entre 18 e 45 anos;
- ✓ Praticantes assíduos de musculação há pelo menos 2 anos, mínimo de 3 vezes por semana;

- ✓ Usuários de anabolizantes há pelo menos 2 anos (drogas injetáveis e/ou orais), com pelo menos 2 ciclos de EAA por ano.

B) Critérios de Inclusão para o grupo NUEAA:

- ✓ Homens com idade entre 18 e 45 anos;
- ✓ Praticantes assíduos de musculação há pelo menos 2 anos, no mínimo 3 vezes por semana;
- ✓ Nunca terem usado qualquer tipo de anabolizantes.

C) Critérios de exclusão para os grupos:

- ✓ Realizar treinamento aeróbio, doença arterial coronariana já documentada, diabetes mellitus, alcoolismo, fumantes, uso de medicamentos anti-hipertensivos, dislipidêmicos e tireoidianos.

O grupo sedentário não poderia estar envolvido com a prática de exercícios físicos regulares nos últimos 6 meses, não utilizarem medicamentos para pressão arterial, colesterol e diabetes, e não serem obesos [índice de massa corporal >30 kg/m²]

Todos os indivíduos selecionados foram matriculados no Ambulatório de Cardiologia Esportiva da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração (InCor - HCFMUSP), e foram submetidos à anamnese e exame clínico no início do estudo. Para o grupo UEAA, foi realizado um questionário para saber o tipo, tempo e dosagem de EAA. Além disso, foi realizada uma coleta de urina (doping urinário) em todos os 50 participantes para confirmar o uso ou não de EAA, bem como identificar o tipo utilizado durante o estudo.

Após informados verbalmente de todos os procedimentos, benefícios e riscos que seriam submetidos, todos os participantes assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). O TCLE está apresentado no apêndice.

3.3 Coleta de dados

Artigo 1. Por meio de uma coleta de sangue, foram realizadas as dosagens do perfil lipídico, hormonal, biomarcadores e inflamatórios. Todos os indivíduos foram orientados a suspenderem a prática de atividade física por 48 horas e a ficarem 12 horas de jejum antes da realização do exame. O efluxo do colesterol foi avaliado pelo efluxo do ^{14}C -colesterol em células de macrófagos de camundongos em cultura. A porcentagem do efluxo do colesterol foi calculado da seguinte maneira: ^{14}C -colesterol no meio / (^{14}C -colesterol no meio + ^{14}C -colesterol na célula) x 100. Figura 3.

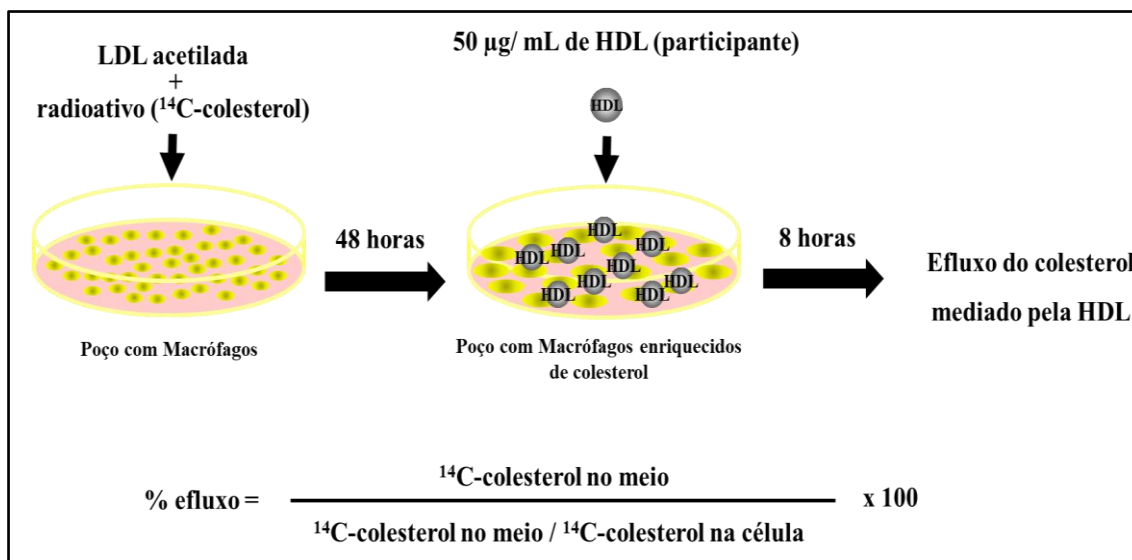


Figura 3. Efluxo do colesterol mediado pela HDL.

Para a atividade antioxidante da HDL, foi calculado o tempo (minutos) de resistência da LDL à oxidação (“lag time”) entre o início da reação e a intersecção do

tempo com a reta extrapolada da fase de propagação, e a razão máxima de formação de dienos conjugados, determinada pela absorbância máxima/min ⁵⁰. O *lag time* de oxidação das LDL representa o tempo em que estas lipoproteínas resistem à oxidação. Ele é determinado pelo ponto onde o incremento linear da absorbância cruza com a linha do tempo. Quanto maior o "*lag time*", maior será o tempo que essas LDL resistem à oxidação. (Figura 4).

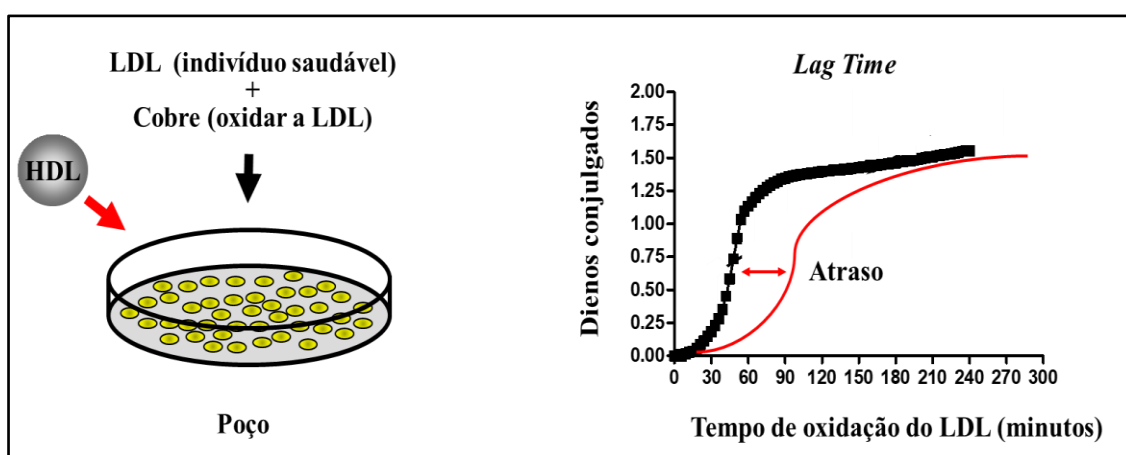


Figura 4. Capacidade antioxidante da HDL. Tempo que a LDL resiste à oxidação

Todas as análises de Angiotomografia de Coronárias foram realizadas no Centro de Diagnóstico por Imagem do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foi realizado uma coleta de urina em todos os participantes para a realização da análise toxicológica por meio da cromatografia líquida de ultra performance com detecção de espectrometria de massa (UPLC-MS/MS) em todos os indivíduos participantes do estudo para provar a presença e ausência de EAA, adaptado de Campos e colaboradores ⁵¹. Adicionalmente, a relação de concentração de

testosterona/epitesterona (T/E) foi realizada. Uma relação T/E superior a 6 indica abuso de anabolizantes ⁵².

A densitometria computadorizada por absorciometria radiológica de dupla energia (DXA), foi utilizado para avaliar a composição corporal dos indivíduos. Trata-se de um procedimento de imagem, de alta tecnologia, que permite a quantificação da gordura e do músculo, assim como, o conteúdo mineral ósseo e estruturas ósseas mais profundas do corpo. Todos os detalhes dos procedimentos estão descritos no artigo 1.

Artigo 2. Em um subgrupo dos participantes do Artigo 1 (grupo UEAA; n=10 e grupo NUEAA; n=10), foi avaliado o comportamento do fluxo sanguíneo (*Shear Rate*) por meio do ultrassom da artéria braquial (Figura 5). Adicionalmente, o perfil lipídico, glicemia e PCR-us, além das medidas de pressão arterial e atividade nervosa simpática muscular foram avaliados. Todos os detalhes dos procedimentos estão descritos no artigo 2.



Figura 5. Avaliação do comportamento do fluxo sanguíneo (*Shear Rate*) da artéria braquial.

4. Análise Estatística

Artigo 1: Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ou mediana \pm IQR (25% - 75%; *IQR= interquartile range*). Os dados foram testados para normalidade usando *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância de um caminho (ANOVA) e quando encontrado significância, foi utilizado a comparação de *Post-hoc* de *Scheffe*. Para os dados não paramétricos, foi utilizado a análise de *Kruskal-Wallis*. O teste *Pearson Chi-Square* foi utilizado quando necessário. A correlação de *Spearman* foi utilizada para testar a associação entre as variáveis. Foi aceito como diferença significativa $p < 0,05$.

Artigo 2: Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ou mediana \pm IQR (25% - 75%; *IQR= interquartile range*). Os dados foram testados para normalidade usando *Shapiro Wilk*. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste *T-Student*. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. A correlação de *Sperman* foi utilizada para testar a associação entre as variáveis. Foi aceito como diferença significativa $p < 0,05$.

6. Resultados

Artigo 1

Souza FR, Dos Santos MR, Porello RA, Fonseca GWPD, Sayegh ALC, Lima TP, Ferreira FD, Oliveira TF, Yonamine M, Takayama L, Pereira RMR, Negrão CE, Passarelli M, Rochitte CE, Alves MJNN. *Diminished cholesterol efflux mediated by HDL and coronary artery disease in young male anabolic androgenic steroid users.* *Atherosclerosis.* 2019 Apr; 283:100-105.

Nesse estudo, avaliamos a funcionalidade da HDL (efluxo do colesterol e capacidade antioxidante), e a presença de doença arterial coronariana em praticantes de musculação usuários e não usuários de EAA, e de indivíduos sedentários. Os principais resultados foram: 1) Usuários de EAA apresentam menor efluxo do colesterol mediado pela HDL; 2) O abuso de EAA está correlacionado com o menor efluxo do colesterol e maior prevalência de doença arterial coronariana; e 3) foram encontradas placas ateroscleróticas em 25% do grupo usuários de EAA, em pelo menos duas artérias coronárias. Por outro lado, não se observou presença de placa nos grupos NUEAA e CS (artigo em anexo).

Artigo 2.

Souza FR, Sales ARK, Dos Santos MR, Porello RA, Fonseca GWPD, Sayegh ALC, Filho ACB, Pereira RMR, Takayama L, Oliveira TF, Yonamine M, Negrão CE, Alves MJNN. ***Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users.*** Scand J Med Sci Sports. 2019 Mar;29(3):422-429.

Nesse estudo, avaliamos o comportamento do fluxo sanguíneo “*Shear Rate*” da artéria braquial em um subgrupo dos participantes do artigo. (grupo UEAA e grupo NUEAA). Os principais resultados foram: 1) Usuários de EAA apresentam maior fluxo retrógrado e oscilatório na artéria braquial; 2) Significativa associação do fluxo retrógrado e oscilatório com o aumento da ANSM; e 3) Maior concentrações da PCR-us, sugerindo aumento do perfil inflamatório, comparado aos não usuários de EAA. (artigo em anexo).

6. Análise crítica

O uso abusivo de esteroides androgênicos anabolizantes tem sido associado com diversas alterações no sistema cardiovascular^{21, 25, 42} dentre elas, o desenvolvimento de DAC^{30, 53}. Mas até o momento, os mecanismos que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de DAC nessa população, não eram totalmente esclarecidos.

O objetivo principal desse estudo foi investigar alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no processo aterosclerótico, além de confirmar os achados de aumento da prevalência de DAC nessa população. Como é de conhecimento, o uso de EAA pode reduzir as concentrações plasmáticas de HDL e aumentar as concentrações plasmáticas de LDL^{21, 33}, ambos associados a fatores de risco para doença cardiovascular⁵⁴. Nesse estudo, além das concentrações reduzidas de HDL, frequentemente observado nessa população, demonstrou-se um novo achado, onde usuários de EAA apresentaram prejuízo da funcionalidade da HDL para realizar o efluxo do colesterol, ou seja, redução da capacidade da HDL em remover o colesterol de macrófagos. Dessa maneira, a redução do efluxo do colesterol pode levar a maior acúmulo de colesterol no macrófago, que por sua vez, reduz o transporte reverso do colesterol. Essa alteração pode estar associada ao desenvolvimento aterosclerótico precoce nessa população. De fato, encontrou-se placas ateroscleróticas em 25% do grupo usuários de EAA. Ao contrário, não se observou a presença de placas ateroscleróticas nos grupos não usuários. Além disso, demonstrou-se uma associação entre o tempo de uso dos EAA com menor efluxo do colesterol mediado pela HDL e, com a presença de DAC.

Um resultado inesperado, entretanto, foi se observar que havia um aumento da capacidade antioxidante da HDL nos usuários de EAA quando comparado aos grupos não usuários. Esse resultado sugere que a HDL dos UEAA, pode proteger por mais tempo a LDL de sofrer oxidação. Todavia, foi analisado somente o tempo de oxidação, não foi

possível quantificar a LDL oxidada. Embora a explicação para esse resultado não seja o objetivo principal desse trabalho, há evidências na literatura de que a reposição hormonal de testosterona aumenta as concentrações da paraoxanase-1 (PON1) ⁵⁵. A PON1 tem importante capacidade antioxidante e poderia estar elevada em usuários de EAA. Essa hipótese, entretanto, necessitará de investigações futuras.

Outro resultado novo do presente trabalho (Artigo 2) diz respeito à alteração do comportamento de fluxo sanguíneo (*Shear rate - SR*) da artéria braquial. Estudos *in vitro* usando células de cultura e artérias isoladas, demonstraram que o *shear stress* causado pelo fluxo anterógrado induz expressões de genes com perfil antiaterogênico ^{56, 57}. Por outro lado, quando essas células foram expostas às alterações do fluxo, o *shear stress* causado por esse distúrbio de fluxo induziu aumento da expressão de genes proaterogênico como por exemplo, interleucinas e endotelina-1, que podem favorecer o desenvolvimento de aterosclerose ⁵⁸. O distúrbio no *SR* foi observado pela primeira vez em idosos e os mecanismos envolvidos nessa alteração não são totalmente compreendidos, mas, até o momento, acredita-se que essa alteração pode estar associada com o aumento da ANSM e menor biodisponibilidade de óxido nítrico em idosos quando comparado a jovens saudáveis ⁴⁷.

Interessantemente, foi observado em nesse estudo que jovens usuários de EAA também apresentam distúrbio no comportamento do *SR*, o qual foi associado com maior ANSM, quando comparado aos jovens não usuários de EAA. Esses resultados são clinicamente importantes, porque sugerem que o uso abusivo de EAA pode gerar aumento do *SR* retrógrado e oscilatório. Essas alterações, podem ser um dos mecanismos associados com o desenvolvimento de DAC precoce nessa população.

Finalmente, a prática de exercício físico leva a benefícios importantes para o sistema cardiovascular. O uso abusivo de anabolizantes parece interferir de maneira

negativa, se contrapondo a esses benefícios promovidos pelo treinamento físico. O dano vascular coronariano provocado, sugere um envelhecimento cardiovascular precoce em jovens usuários de EAA.

7. Conclusão

Com os resultados encontrados nesse trabalho, podemos concluir que o uso abusivo de esteroides androgênicos anabólicos pode reduzir o efluxo do colesterol mediado pela HDL e sugerir um aumento da prevalência de doença arterial coronariana precoce. Além disso, essas substâncias podem gerar um aumento do distúrbio do fluxo sanguíneo (*Shear Rate*) da arterial braquial que foi associado com o aumento da atividade nervosa simpática muscular, nessa população.

Todas essas alterações, em conjunto, podem estar, pelo menos em parte, envolvidas com os mecanismos de desenvolvimento de doença arterial coronariana precoce em jovens usuários de esteroides androgênicos anabólicos.

8. Referências bibliográficas

1. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology*. 2008;154(3):502-21.
2. Aires MM. Gônadas. In: Fisiologia, editor. Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 1051-76.
3. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(12):3689-98.
4. Wysoczanski M, Rachko M, Bergmann SR. Acute myocardial infarction in a young man using anabolic steroids. *Angiology*. 2008;59(3):376-8.
5. van Amsterdam J, Opperhuizen A, Hartgens F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;57(1):117-23.
6. Filippatos G, Rauchhaus M, Anker SD. Decompensated heart failure and cachexia: Is it time to legalize anabolics? *Int J Cardiol*. 2006;111(1):185-6.
7. Kanayama G, Pope HG, Jr. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. *Mol Cell Endocrinol*. 2017.
8. Dirix AT, K. . Olympic Book of Sports Medicine in Doping Control in Sports. 1998;3. ed. .

9. Ghaphery NA. Performance-enhancing drugs. *Orthop Clin North Am.* 1995;26(3):433-42.
10. Fitch KD. Androgenic-anabolic steroids and the Olympic Games. *Asian J Androl.* 2008;10(3):384-90.
11. Yesalis CE, Bahrke MS. Doping among adolescent athletes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000;14(1):25-35.
12. Forbes GB. The effect of anabolic steroids on lean body mass: the dose response curve. *Metabolism: clinical and experimental.* 1985;34(6):571-3.
13. Yeater R, Reed C, Ullrich I, Morise A, Borsch M. Resistance trained athletes using or not using anabolic steroids compared to runners: effects on cardiorespiratory variables, body composition, and plasma lipids. *British journal of sports medicine.* 1996;30(1):11-4.
14. Kadi F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *Br J Pharmacol.* 2008;154(3):522-8.
15. Laranjeira R, Madruga C, Pinsky I, Caetano R, Mitsuhiro S, Castello G. II levantamento nacional de álcool e drogas (LENAD)-2012. *São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP.* 2014.

16. Andrade AG, Duarte Pdo C, Barroso LP, Nishimura R, Alberghini DG, Oliveira LG. Use of alcohol and other drugs among Brazilian college students: effects of gender and age. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2012;34(3):294-305.
17. Abrahin OSC, Souza NSF, Sousa ECd, Moreira JKR, Nascimento VCd. Prevalence of the use of anabolic androgenic steroids by physical education students and teachers who work in health clubs. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2013;19(1):27-30.
18. Abrahin OS, Sousa EC, Santos AM. Prevalence of the use of anabolic-androgenic steroids in Brazil: a systematic review. *Substance use & misuse*. 2014;49(9):1156-62.
19. Morgentaler A, Zitzmann M, Traish AM, Fox AW, Jones TH, Maggi M, et al. Fundamental Concepts Regarding Testosterone Deficiency and Treatment: International Expert Consensus Resolutions. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(7):881-96.
20. Sjoqvist F, Garle M, Rane A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet*. 2008;371(9627):1872-82.
21. Alves MJ, Dos Santos MR, Dias RG, Akiho CA, Laterza MC, Rondon MU, et al. Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users. *Medicine and science in sports and exercise*. 2010;42(5):865-71.
22. Porello RA, Dos Santos MR, FR DES, GWP DAF, Sayegh ALC, TF DEO, et al. Neurovascular Response during Exercise and Mental Stress in Anabolic Steroid Users. *Medicine and science in sports and exercise*. 2018;50(3):596-602.

23. Beutel A, Bergamaschi CT, Campos RR. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;93(1):43-8.
24. Santos MRD, Sayegh ALC, Armani R, Costa-Hong V, Souza FR, Toschi-Dias E, et al. Resting spontaneous baroreflex sensitivity and cardiac autonomic control in anabolic androgenic steroid users. *Clinics.* 2018;73:e226.
25. dos Santos MR, Dias RG, Laterza MC, Rondon MU, Braga AM, de Moraes Moreau RL, et al. Impaired post exercise heart rate recovery in anabolic steroid users. *International journal of sports medicine.* 2013;34(10):931-5.
26. D'Andrea A, Caso P, Salerno G, Scarafile R, De Corato G, Mita C, et al. Left ventricular early myocardial dysfunction after chronic misuse of anabolic androgenic steroids: a Doppler myocardial and strain imaging analysis. *Br J Sports Med.* 2007;41(3):149-55.
27. Urhausen A, Albers T, Kindermann W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart.* 2004;90(5):496-501.
28. Nottin S, Nguyen LD, Terbah M, Obert P. Cardiovascular effects of androgenic anabolic steroids in male bodybuilders determined by tissue Doppler imaging. *Am J Cardiol.* 2006;97(6):912-5.
29. Baggish AL, Weiner RB, Kanayama G, Hudson JI, Picard MH, Hutter AM, Jr., et al. Long-term anabolic-androgenic steroid use is associated with left ventricular dysfunction. *Circ Heart Fail.* 2010;3(4):472-6.

30. McNutt RA, Ferencik GS, Kirlin PC, Hamlin NJ. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am J Cardiol.* 1988;62(1):164.
31. Hausmann R, Hammer S, Betz P. Performance enhancing drugs (doping agents) and sudden death--a case report and review of the literature. *Int J Legal Med.* 1998;111(5):261-4.
32. Morikawa AT, Maranhao RC, Alves MJ, Negrao CE, da Silva JL, Vinagre CG. Effects of anabolic androgenic steroids on chylomicron metabolism. *Steroids.* 2012;77(13):1321-6.
33. Baldo-Enzi G, Giada F, Zuliani G, Baroni L, Vitale E, Enzi G, et al. Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self-administration of anabolic steroids. *Metabolism.* 1990;39(2):203-8.
34. Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, Chenevert C, Saritelli AL, Sady MA, et al. Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *JAMA.* 1989;261(8):1165-8.
35. Lane HA, Grace F, Smith JC, Morris K, Cockcroft J, Scanlon MF, et al. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *Eur J Clin Invest.* 2006;36(7):483-8.
36. Mewis C, Spyridopoulos I, Kuhlkamp V, Seipel L. Manifestation of severe coronary heart disease after anabolic drug abuse. *Clin Cardiol.* 1996;19(2):153-5.

37. Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev.* 2004;12(2):107-19.
38. O'Connell BJ, Genest J, Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation.* 2001;104(16):1978-83.
39. Murugesan G, Sa G, Fox PL. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res.* 1994;74(6):1149-56.
40. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England journal of medicine.* 2011;364(2):127-35.
41. Kosmas CE, Christodoulidis G, Cheng JW, Vittorio TJ, Lerakis S. High-density lipoprotein functionality in coronary artery disease. *The American journal of the medical sciences.* 2014;347(6):504-8.
42. Santora LJ, Marin J, Vangrow J, Minegar C, Robinson M, Mora J, et al. Coronary calcification in body builders using anabolic steroids. *Preventive cardiology.* 2006;9(4):198-201.
43. Baggish AL, Weiner RB, Kanayama G, Hudson JI, Lu MT, Hoffmann U, et al. Cardiovascular Toxicity of Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use. *Circulation.* 2017;135(21):1991-2002.

44. Arad Y, Goodman KJ, Roth M, Newstein D, Guerci AD. Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: the St. Francis Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(1):158-65.
45. Kondos GT, Hoff JA, Sevrukov A, Daviglius ML, Garside DB, Devries SS, et al. Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events: a 37-month follow-up of 5635 initially asymptomatic low- to intermediate-risk adults. *Circulation*. 2003;107(20):2571-6.
46. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(5):677-85.
47. Casey DP, Padilla J, Joyner MJ. alpha-adrenergic vasoconstriction contributes to the age-related increase in conduit artery retrograde and oscillatory shear. *Hypertension*. 2012;60(4):1016-22.
48. Soeki T, Sata M. Inflammatory Biomarkers and Atherosclerosis. *International heart journal*. 2016;57(2):134-9.
49. Severo CB, Ribeiro JP, Umpierre D, Da Silveira AD, Padilha MC, De Aquino Neto FR, et al. Increased atherothrombotic markers and endothelial dysfunction in steroid users. *European journal of preventive cardiology*. 2013;20(2):195-201.
50. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 1989;6(1):67-75.

51. Campos DRD, Yonamine M, Moreau RLDM. Determinação de esteróides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;41(4):467-76.
52. van de Kerkhof DH, de Boer D, Thijssen JH, Maes RA. Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis. *J Anal Toxicol*. 2000;24(2):102-15.
53. Souza FR, Dos Santos MR, Porello RA, Fonseca G, Sayegh ALC, Lima TP, et al. Diminished cholesterol efflux mediated by HDL and coronary artery disease in young male anabolic androgenic steroid users. *Atherosclerosis*. 2019;283:100-5.
54. Glazer G. Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. A literature review. *Archives of internal medicine*. 1991;151(10):1925-33.
55. Rubinow KB, Vaisar T, Tang C, Matsumoto AM, Heinecke JW, Page ST. Testosterone replacement in hypogonadal men alters the HDL proteome but not HDL cholesterol efflux capacity. *Journal of lipid research*. 2012;53(7):1376-83.
56. Conway DE, Williams MR, Eskin SG, McIntire LV. Endothelial cell responses to atheroprone flow are driven by two separate flow components: low time-average shear stress and fluid flow reversal. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(2):H367-74.
57. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2009;6(1):16-26.

58. Lopez Gelston CA, Balasubbramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circulation research*. 2018;122(8):1094-101.

9. Artigos 1 e 2



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

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

Diminished cholesterol efflux mediated by HDL and coronary artery disease in young male anabolic androgenic steroid users



Francis Ribeiro de Souza^{a,**}, Marcelo Rodrigues Dos Santos^a, Rafael Armani Porello^a, Guilherme Wesley Peixoto da Fonseca^a, Ana Luiza Carrari Sayegh^a, Thaís Pinheiro Lima^a, Fabiana Dias Ferreira^b, Tiago Franco de Oliveira^c, Maurício Yonamine^d, Liliam Takayama^e, Rosa Maria Rodrigues Pereira^e, Carlos Eduardo Negrão^a, Marisa Passarelli^{b,f}, Carlos Eduardo Rochitte^a, Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves^{a,*}

^a Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Lipídeos (LIM 10), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Farmacociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^e Laboratório de Metabolismo Ósseo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^f Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Anabolic androgenic steroids (AAS) abuse impairs the cholesterol efflux mediated by HDL.
- AAS abuse seems to be correlated with lower cholesterol efflux and subclinical coronary artery disease (CAD).
- We found at least 2 coronary arteries with plaques in 25% of AAS users.

ARTICLE INFO

Keywords:

Cholesterol efflux

HDL

Coronary artery disease

Anabolic androgenic steroid

ABSTRACT

Background and aims: Anabolic androgenic steroids (AAS) have been associated with coronary artery disease (CAD). AAS abuse leads to a remarkable decrease in high-density lipoprotein (HDL) plasma concentration, which could be a key factor in the atherosclerotic process. Moreover, not only the concentration of HDL, but also its functionality, plays a pivotal role in CAD. We tested the functionality of HDL by cholesterol efflux and antioxidant capacity. We also evaluated the prevalence of CAD in AAS users.

Methods: Twenty strength-trained AAS users (AASU) age 29 ± 5 yr, 20 age-matched strength-trained AAS nonusers (AASNU), and 10 sedentary controls (SC) were enrolled in this cross-sectional study. Functionality of HDL was evaluated by ¹⁴C-cholesterol efflux and the ability of HDL in inhibiting LDL oxidation. Coronary artery was evaluated with coronary computed tomography angiography.

Results: Cholesterol efflux was lower in AASU compared with AASNU and SC (20 vs. 23 vs. 24%, respectively, $p < 0.001$). However, the lag time for LDL oxidation was higher in AASU compared with AASNU and SC (41 vs 13 vs 11 min, respectively, $p < 0.001$). We found at least 2 coronary arteries with plaques in 25% of AASU. None of the AASNU and SC had plaques. The time of AAS use was negatively associated with cholesterol efflux.

Conclusions: This study indicates that AAS abuse impairs the cholesterol efflux mediated by HDL. Long-term AAS use seems to be correlated with lower cholesterol efflux and early subclinical CAD in this population.

1. Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) abuse among young people is a

widespread problem worldwide. Adverse events like sudden cardiac death and heart attack have been reported in AAS users [1–3], which could be associated with coronary artery disease (CAD) [4].

* Corresponding author. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Subsolo-1, InCor, São Paulo, SP, 05403-900, Brazil. Tel.: +55 11 2661 5099.

** Corresponding author.

E-mail addresses: francisribeiro@usp.br (F.R.d. Souza), janieire.alves@incor.usp.br (M.J.d.N.N. Alves).

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.006>

Received 4 December 2018; Received in revised form 5 February 2019; Accepted 6 February 2019

Available online 12 February 2019

0021-9150/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Many studies have shown that the illicit use of AAS changes lipid profile, leading to lower high-density lipoprotein (HDL) and higher low-density lipoprotein (LDL) levels [5–8]. It is well known that decreased concentration of HDL is a key factor in the atherosclerotic process [9,10]. More interestingly, not only the concentration of HDL, but also its functionality plays a pivotal role in CAD [11]. Kosmas and collaborators reported that the cholesterol efflux capacity from macrophages is an excellent metric of HDL functionality, because it has a strong inverse association with the risk of CAD, independently of HDL plasma levels [12].

Recently, Baggish and collaborators showed in older adult men that long-term AAS utilization seems to be associated with myocardial dysfunction and CAD [4]. However, whether AAS abuse leads to impairment of HDL functionality is completely unknown.

In the present study, we evaluated the functionality of HDL, which could be one of the mechanisms in the atherosclerotic process. We also evaluated the prevalence of subclinical CAD in AAS users.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The local Human Subject Protection Committee approved this cross-sectional study (3945/13/070), and each participant provided written informed consent. Between April 2015 and April 2017, we enrolled 68 health male participants (asymptomatic and without previous cardiovascular disease) between 18 and 45 years of age. Of these, 18 were excluded due to lack of time to participate in the study, obesity, and smoking (see inclusion criteria below). Fifty age-matched participants were evaluated and allocated: 20 AAS users (group AASU), 20 AAS nonusers (group AASNU). Both groups (AASU and AASNU) were recreational weightlifters or amateur bodybuilding athletes who were recruited from gymnasiums. In addition, 10 age-matched sedentary men (without regular exercise training and/or sports, < 150 min/week of physical activity such as walking with light/moderate intensity) without cardiovascular disease (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, obesity [body mass index > 30 kg/m²]) served as a control group. Exclusion criteria for all participants were with known CAD, smoking, alcohol consumption, use of diuretics, statins and/or anti-hypertensive medications, and liver and kidney disease.

AASU and AASNU groups had been involved in strength training for at least 2 years. AASU should be self-administering AAS in periodic cycles lasting from 8 to 12 weeks for at least 2 years with 2–4 cycles per year. All AASU were on a cycle over the course of the study.

The doping urine test was performed by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (UPLC-MS/MS) in all groups to document the presence of AAS. In addition, the testosterone/epitestosterone (T/E) concentration ratio in the urine was determined as previously reported [13]. A T/E ratio greater than six indicates exogenous testosterone use [13].

2.2. Measures and procedures

All the participants abstained from sports supplements, caffeine-containing products, and exercise training for 48 h before the exams. Arterial blood pressure was measured using the auscultatory method with the participant in a seated position after 10 min of rest in a quiet, temperature-controlled (21 °C) room.

2.3. Blood measures

Blood sample was collected in the morning (between 8:00–10:00 a.m.) after 12 h fasting and after 30 min of resting for lipid assessment (total cholesterol, LDL, HDL, and triglycerides), glucose, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), hepatic and kidney biomarkers, and hormonal parameters.

2.4. Determination of cholesterol efflux mediated by HDL

The cholesterol efflux was evaluated by ¹⁴C-cholesterol efflux mediated by HDL with macrophages cultured cells from mice. Cholesterol efflux assays were done in quadruplicate wells in one single experimental batch in order to avoid inter assay variability. The mean value of basal efflux (considering all plaques) was subtracted from the efflux value obtained with the addition of patient's HDL. Then, it was obtained the cholesterol efflux specifically mediated by HDL. The percentage of ¹⁴C-cholesterol efflux was calculated as follow; ¹⁴C-cholesterol in medium/¹⁴C cholesterol in medium + ¹⁴C cholesterol in cells x 100. Detailed determination of cholesterol Efflux is described in the Supplementary Data.

2.5. HDL antioxidant capacity

Low-density lipoproteins (LDL), isolated from a pool of healthy human plasma donors, were dialyzed against PBS without EDTA and then diluted to obtain a concentration of 40 mg of LDL protein in 500 µL of deionized H₂O. The time (min) of LDL resistance to oxidation (lag time) was calculated between the start of the reaction and the intersection of time with the extrapolated line of the propagation phase, and the maximum rate of conjugated diene formation determined by maximum absorbance/min [14]. Detailed determination of HDL antioxidant capacity is described in the Supplementary Data.

2.6. Coronary computed tomography angiography image acquisition

To assess coronary artery plaque and calcification, all participants underwent coronary computed tomography angiography according to the guidelines of the Society of Cardiovascular Computed Tomography (SCCT) [15]. Detailed CTA method is described in the Supplementary Data.

2.7. Body composition

Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), (Discovery DXA system, Hologic Inc) to measure total fat-free mass, fat mass, and fat percentage in all participants. DXA was used to exclude possible bias of body mass index (BMI) among the participants.

2.8. General cardiovascular risk

To assess the clinical cardiovascular risk score, we used the Castelli Index to assess the risk of development of coronary artery disease (CAD) [16] and Framingham Heart Study Score that predicts risk of specific atherosclerotic cardiovascular disease (CVD risk) [9]. Detailed general cardiovascular risk is described in the Supplementary Data.

2.9. Statistical analysis

The sample size calculation was based on difference of 5% alpha error and 20% beta error to detect a mean difference in CAD (primary outcome) in any of the two groups. Thus, the delta gradient is 100% for 17 patients for each group (AASU and AASNU) with a statistical power of 84%. In addition, 10 sedentary men (group SC) were included. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) or median (interquartile range – IQR – 25%–75%). The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the normal distribution of the variables studied. The parametric data were obtained by one-way ANOVA analysis of variance. When a significant difference was found, the Scheffe post-hoc comparison test was used. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were used for nonparametric data. The chi-square test was used for categorical variables. Bivariate correlation test (Spearman) was also used. *p* < 0.05 indicates statistical significance. The Statistical

Table 1

Physical characteristics, clinical biomarkers, and hormonal profile in anabolic androgenic steroid users (AASU), anabolic androgenic steroid nonusers (AASNU), and sedentary control (SC).

Variables	AASU (n = 20)	AASNU (n = 20)	SC (n = 10)	p
Age (years)	29 ± 5	29 ± 5	29 ± 3	0.861
Weight (kg)	97.4 (90.1–104.9) *†	82.0 (74.0–88.0)	74.8 (70.0–87.5)	0.003
Height (m)	1.78 ± 0.04	1.80 ± 0.09	1.76 ± 0.08	0.841
BMI (kg/m ²)	31.11 ± 3.45 *†	25.45 ± 1.92	25.70 ± 3.38	< 0.001
SBP (mmHg)	130 (130–140) *†	120 (100–120)	120 (110–120)	< 0.001
DBP (mmHg)	90 (80–90) *†	80 (70–80)	80 (70–80)	< 0.001
TC (mg/dL)	186 (143–208)	155 (134–188)	189 (175–200)	0.07
HDL-c (mg/dL)	19 (13–25) *†	44 (41–54)	50 (40–55)	< 0.001
LDL-c (mg/dL)	144 (105–179) *†	96 (81–125)	122 (105–132)	0.001
Non-HDL-c (mg/dL)	157 (121–198) †	111 (94–139) *	147 (128–152)	0.03
Triglycerides (mg/dL)	74 ± 23	75 ± 35	98 ± 45	0.15
Glucose (mg/dL)	90 ± 7	90 ± 6	92 ± 8	0.66
Urea (mg/dL)	36 ± 8	33 ± 6	30 ± 9	0.13
Creatinine (mg/dL)	1.30 ± 0.16 *†	1.11 ± 0.21	1.02 ± 0.12	< 0.001
GOT (U/L)	41 (34–55) *†	23 (20–32)	23 (19–29)	< 0.001
GPT (U/L)	63 (54–88) *†	36 (30–51)	35 (29–54)	0.001
Gamma GT (U/L)	26 (21–36) *	29 (24–44)	36 (27–53)	0.02
TSH (uIU/mL)	1.91 (1.11–2.49)	1.73 (1.26–2.24)	1.54 (1.00–2.77)	0.74
FSH (mIU/mL)	0.10 (0.10–0.10) *†	2.88 (1.90–4.91)	2.30 (2.48–4.60)	< 0.001
LH (mIU/mL)	0.10 (0.10–0.10) *†	2.73 (2.03–3.49)	3.55 (2.57–6.09)	< 0.001
Prolactin (ng/mL)	6.70 (4.67–9.61)	7.66 (5.21–8.47)	6.13 (4.40–7.49)	0.45
Lean mass (kg)	82.05 ± 9.18 *†	62.81 ± 7.15 *	53.94 ± 7.38	< 0.001
Fat (kg)	12.0 (9.9–15.1) *†	15.5 (11.7–18.1) *	19.5 (15.2–26.8)	0.033
Fat percentage (%)	13.18 ± 5.62 *†	19.27 ± 4.33 *	27.59 ± 7.49	0.005
BMD (kg)	3.51 ± 0.32 *	3.33 ± 0.44	3.02 ± 0.36	0.007

Data are presented as mean ± SD or median ± IQR (25%–75%; IQR = interquartile range).

BMI = body mass index, BMD = bone mineral density, SBP = systolic blood pressure, DBP = diastolic blood pressure, TC = total cholesterol, HDL-c = high-density lipoprotein cholesterol, LDL-c = low-density lipoprotein cholesterol, GOT = glutamic-oxalacetic transaminase; GPT = glutamic-pyruvic transaminase; Gamma GT = gamma-glutamyl transferase; TSH = thyroid stimulating hormone; FSH = follicle stimulating hormone; LH = luteinizing hormone.

**p* < 0.05 vs. SC; †*p* < 0.05 vs. AASNU.

Package for the Social Sciences (SPSS) version 23 was used to perform all the statistical analyses.

3. Results

Fifty age-matched participants were evaluated and allocated: 20 AAS users (group AASU), 20 AAS nonusers (group AASNU) and 10 sedentary men (group SC). Physical characteristics, clinical biomarkers, and hormonal profile are shown in Table 1. Cumulative lifetime duration of strength training, AAS use and types of AAS used are shown in Supplementary Table 1.

The cholesterol efflux mediated by HDL was significantly lower in AASU compared with AASNU and SC (Fig. 1A). On the contrary, the lag time of LDL oxidation was higher in AASU than in AASNU and SC (Fig. 1B).

In addition, AASU had a modified composition of HDL particles with reduced HDL-cholesterol, HDL-triglycerides, HDL-apo AI, and HDL-phospholipids compared with AASNU and SC (Fig. 2A–D, respectively).

We found at least 2 coronary artery segments with lipid, fibro-lipid,

and/or calcium plaques in 25% of AASU (Table 2). In contrast, none of the AASNU and SC participants had CAD. In those AASU who had subclinical CAD, fibro-lipid plaques were in 58%, followed by 27% with lipid plaques, and 15% with calcium plaques (Table 2). The mean total plaque volume was 274.4 mm³, with negative index remodelling of 97.8%, and degree of stenosis from 30 to 50% (Table 2). Left anterior descending artery (LAD), circumflex artery (CX), right artery (RCA), diagonal artery (DI), and first diagonal artery (D1) were the most affected segments (Table 2).

Supplementary Figs. 1A and B shows calcified plaque in the left anterior descending artery (LAD) in a 27-year-old man AAS user, and a mixed plaque in the LAD in a 43-year-old man AAS user, respectively. Moreover, it is interesting to note that one 41-year-old AASU (24 cumulative years of AAS use) had a coronary ulcer in the left anterior descending artery; and one 43-year-old AASU (11 cumulative years of AAS use) underwent cardiac catheterization, but without coronary angioplasty.

We found that the time of AAS use was negatively associated with cholesterol efflux mediated by HDL (Fig. 3A), HDL-cholesterol

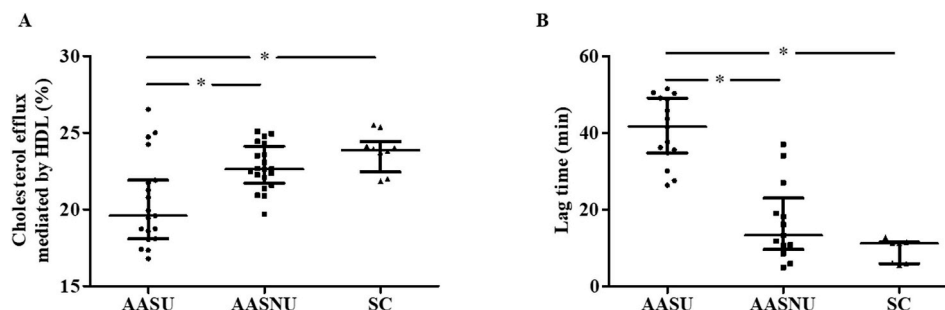


Fig. 1. (A) Cholesterol efflux mediated by high-density lipoprotein (HDL), AASU (n = 19), AASNU (n = 20), and SC (n = 10), and (B) lag time for low-density lipoprotein (LDL) oxidation. AASU (n = 15), AASNU (n = 13), and SC (n = 7).

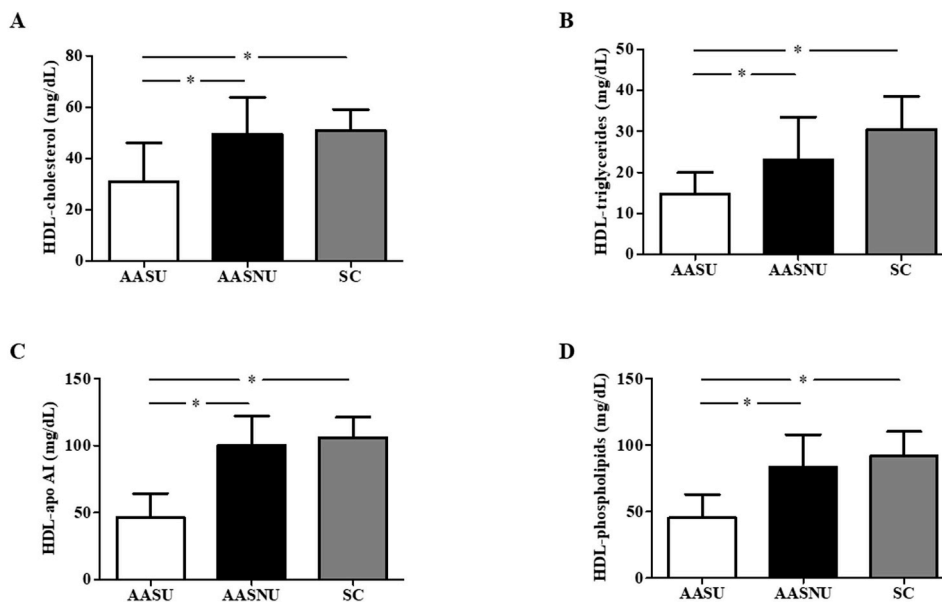


Fig. 2. Composition of a high-density lipoprotein (HDL) particle. AASU (n = 20), AASNU (n = 20), and SC (n = 10).

Table 2

Computed tomography coronary angiography in anabolic androgenic steroid users (AASU), anabolic androgenic steroid nonusers (AASNU), and sedentary control (SC).

	AASU (20)	AASNU (20)	SC (10)	p
Coronary arterial plaque, n	5 (25%) * †	0	0	0.019
History familiar of CAD, n	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	0.814

AASU	Vessel	Location	Lipid plaque, mm ³	Fibro lipid plaque, mm ³	Calcium plaque, mm ³	Total volume, mm ³	‡ Degree of stenosis, %	Index remodelling, %
27-year-old (3 years of AAS use)	LAD	Proximal	35.3 (20.2%)	85.9 (49.2%)	53.5 (30.6%)	174.7	2	81
	LAD	Medial	3.5 (24.0%)	8.7 (60.3%)	2.3 (15.7%)	14.5	1	88
27-year-old (6 years of AAS use)	LAD	Proximal	18.5 (30.4%)	35.4 (58.2%)	6.9 (11.4%)	60.8	1	126
	LCx	Proximal	51.1 (13.4%)	190.7 (50.0%)	139.4 (16.6%)	381.2	1	138
39-year-old (18 years of AAS use)	RCA	Proximal	216.2 (23.4%)	676.6 (73.3%)	29.8 (3.2%)	922.6	2	68
	RCA	Medial	216.2 (23.4%)	242.4 (49.8%)	12.3 (25.7%)	470.9	2	92
	LCx	Medial	22.7 (44.4%)	28.4 (55.6%)	0	51.1	2	88
41-year-old (24 years of AAS use)	LAD	Medial	77.9 (21.5%)	260.0 (72.0%)	25.0 (12.0%)	362.9	2	58
	LCx	Proximal	26.0 (20%)	107.0 (87.0%)	18.0 (15.0%)	151.0	1	38
43-year-old (11 years of AAS use)	LAD	Medial	113.8 (38.2%)	179.2 (60.2%)	0	293.0	1	118
	LAD	Proximal	64.3 (26.2%)	136.1 (55.5%)	44.6 (18.2%)	245.0	4	131
	DI	Proximal	126.6 (39.9%)	147.0 (46.4%)	43.4 (13.7%)	317.0	4	87
	DI	Proximal	56.9 (29.9%)	114.1 (60.1%)	19.0 (10.0%)	190.0	1	132
	RCA	Distal	57.5 (27.7%)	70.1 (33.8%)	79.6 (38.4%)	207.2	1	124
Mean			77.6 (27.3%)	163.0 (58.0%)	33.8 (15.0)	274.4	2	97.8

‡ Represents the degree of stenosis at specific coronary artery segment on a scale of 0–5, where 0 = 0% stenosis, 1 = 1–30%, 2 = 30%–50%, 3 = 51%–70%, 4 = 71%–99%, and 5 = 100%.

CAD = coronary artery disease; LAD = left anterior descending artery; LCX = left circumflex artery; RCA = right coronary artery; DI = diagonal branch artery.

(Fig. 3B), and HDL-apo AI (Fig. 3C). Moreover, the time of AAS use was positively associated with total coronary artery plaque volume (Fig. 3D).

Finally, we also calculated 2 different clinical cardiovascular risk scores, both Castelli Index and Framingham Heart Study scores were higher in AASU compared with AASNU and SC. Vascular aging and hs-CRP were also higher in those men who used AAS (Supplementary Table 2).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to assess the effect of illicit use of AAS on the function of HDL as a possible mechanism involved in CAD in young men. We found that AAS users have

impaired efflux cholesterol capacity mediated by HDL when compared with that in sedentary men or the weightlifters who did not use AAS. In our cohort, about 1 in 4 weightlifters (25%) who used AAS had signs of subclinical CAD on CT. In contrast, none of the AAS nonusers and the sedentary participants had subclinical CAD. In addition, a negative correlation between the time of AAS use with efflux cholesterol was found.

The illicit use of AAS has several cardiovascular implications, such as autonomic imbalance, increased blood pressure, and endothelial dysfunction [7,17,18]. Moreover, AAS abuse is also linked to lower HDL concentration, high levels of coronary artery calcium [19], and increased coronary artery plaque volume [4]. However, the mechanisms involved in subclinical CAD in this population are completely unknown. Santora and collaborators were the first to show an association between

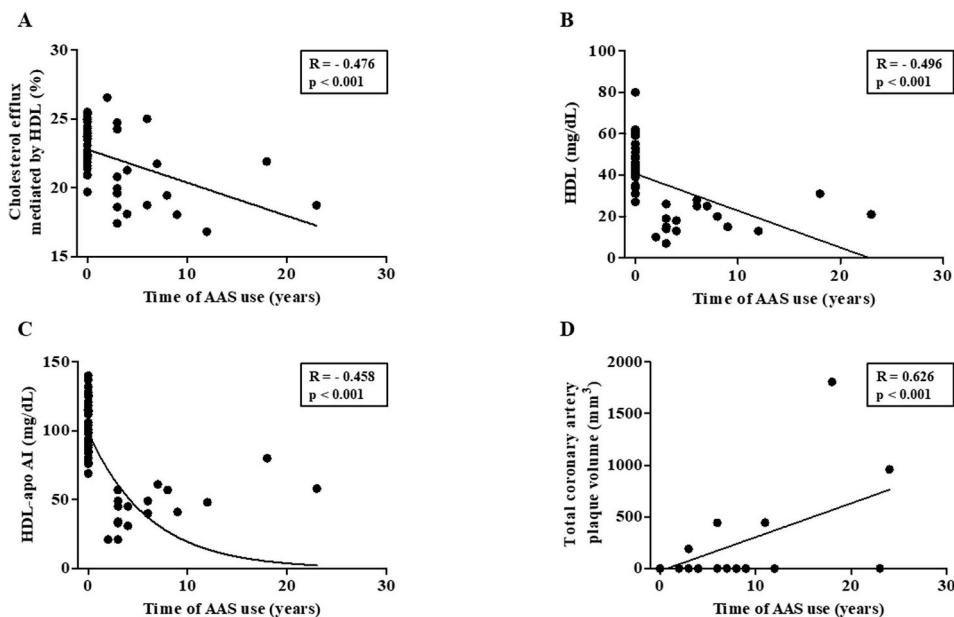


Fig. 3. (A) Time of AAS use and cholesterol efflux mediated by high-density lipoprotein (HDL) AASU ($n = 19$), (B) time of AAS use and HDL concentration AASU ($n = 20$), (C) time of AAS use and HDL-apo AI AASU ($n = 20$), and (D) time of AAS use and total coronary artery plaque AASU ($n = 20$).

AAS abuse with lower HDL concentration and coronary artery calcification [19]. More recently, Baggish and collaborators reported left ventricular dysfunction and premature subclinical CAD in weightlifters who used AAS [4]. However, both studies enrolled middle-aged men with an age range from 28 to 55 years (mean age around 40 years old). In our study, we enrolled only asymptomatic young men, without a history of cardiovascular disease, with the mean age of 29 years. We have demonstrated that even in younger men, the illicit use of AAS has a potential to provoke subclinical CAD.

The illicit use of AAS, mainly those administrated orally, leads to greater hepatic lipase (HL) activity [6]. HL plays a key role in facilitating the uptake of lipoproteins by the liver, which is one the main mechanisms to decrease HDL-cholesterol and apo AI in AASU [6]. In our study, we found a remarkable decrease in HDL plasma concentration, HDL-cholesterol and apo AI. Moreover, HDL-triglycerides and HDL-phospholipids were lower in AAS users. Taken together, these findings show that AAS also alters the structure of HDL, which may impair HDL functionality. In fact, we found that weightlifters who used AAS had a diminished cholesterol efflux, that means a lowered ability of HDL to accept cholesterol from macrophages.

Despite the impairment in cholesterol efflux mediated by HDL, the antioxidant capacity of HDL is higher in AAS users compared with sedentary and AAS nonusers. This finding suggests that HDL protects LDL oxidation for a longer time. However, we only studied the lag time for LDL oxidation. Thus, we do not know how much LDL was oxidized (quantitatively). This issue deserves future study. For instance, in young men without a history of AAS use, resistance training decreases the oxidized LDL in the plasma [20]. The HDL particle is composed of apolipoproteins and enzymes, such as the paraoxonase-1 (PON1), which seems to be influenced by testosterone replacement in older hypogonadal men [21]. PON1 has an antioxidant capacity and may be increased by the supraphysiologic doses of testosterone. However, this hypothesis should be addressed in AAS users.

This study has clinical implications. First, we found that AAS users have decreased cholesterol efflux capacity by HDL, which could be, at last in part, one of the mechanisms associated with subclinical CAD. Second, 25% of young AAS users had signs of subclinical CAD with

high-volume coronary plaque and even coronary luminal stenosis that would not be expected in young men. Third, the most-used general cardiovascular risk, the Castelli Index (ratio of TC:HDL cholesterol) and Framingham Heart Study, were worse in AAS users.

4.1. Limitations

We recognize limitations in our study. We studied only men; therefore, the results should be interpreted with caution in women. The cholesterol efflux capacity mediated by HDL was only evaluated in vitro. Our study was correlational, and the mechanism of the cholesterol efflux capacity mediated by HDL on coronary disease should be addressed in future studies. Despite of limitations on the quantitative plaque characterization, specially the overlap between pixel densities of lipid and fibrotic plaque, this technique is widely used in the literature and has demonstrated the ability to detect plaques that has prognostic value [22].

4.2. Conclusions

This study indicates that AAS abuse impairs the cholesterol efflux mediated by HDL. Long-term AAS use seems to be correlated with lower cholesterol efflux mediated by HDL and early subclinical CAD in this population.

Conflicts of interest

The authors declared they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP 2012/10527-3 to M-J.N.N.A.], by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes to F.R.S. and R.A.P.), by Fundação Zerbini and [FAPESP 2016/24306-0 to M.R.S.], by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico [CNPq to G.W.P.F. and M.P. and CNPq 303573/2015-5 to C.E.N.].

Author contributions

Francis Ribeiro de Souza (Study design, statistics, data collection, writing and final discussion);

Marcelo Rodrigues dos Santos (Study design, statistics, writing and final discussion);

Rafael Armani Porello (Data collection);

Guilherme Wesley Peixoto da Fonseca (Data collection, writing and final discussion);

Ana Luiza Carrari Sayegh (Study design and data collection);

Thaís Pinheiro Lima (Data collection); Fabiana Dias Ferreira (Data collection); Tiago Franco de Oliveira (Doping measurements);

Mauricio Yonamine (Doping measurements);

Liliam Takayama (Body composition)

Rosa Maria Rodrigues Pereira (Body composition);

Carlos Eduardo Negrão (Writing and final discussion);

Marisa Passarelli (Data collection and final discussion)

Carlos Eduardo Rochitte (Data collection and final discussion);

Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves (Study design, writing and final discussion).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.006>.

References

- [1] R.A. McNutt, G.S. Ferenchick, P.C. Kirlin, et al., Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids, *Am. J. Cardiol.* 62 (1988) 164.
- [2] V. Fineschi, I. Riezzo, F. Centini, et al., Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic findings in two fatal cases of body-builders, *Int. J. Leg. Med.* 121 (2007) 48–53.
- [3] P.J. Angell, T.F. Ismail, A. Jabbar, et al., Ventricular structure, function, and focal fibrosis in anabolic steroid users: a CMR study, *Eur. J. Appl. Physiol.* 114 (2014) 921–928.
- [4] A.L. Baggish, R.B. Weiner, G. Kanayama, et al., Cardiovascular toxicity of illicit anabolic-androgenic steroid use, *Circulation* 135 (2017) 1991–2002.
- [5] M.A. Santos, C.V. Oliveira, A.S. Silva, Adverse cardiovascular effects from the use of anabolic-androgenic steroids as ergogenic resources, *Subst. Use Misuse* 49 (2014) 1132–1137.
- [6] A.T. Morikawa, R.C. Maranhao, M.J. Alves, et al., Effects of anabolic androgenic steroids on chylomicron metabolism, *Steroids* 77 (2012) 1321–1326.
- [7] M.J. Alves, M.R. Dos Santos, R.G. Dias, et al., Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users, *Med. Sci. Sports Exerc.* 42 (2010) 865–871.
- [8] F.R. Souza, A.R.K. Sales, M.R. Dos Santos, et al., Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users, *Scand. J. Med. Sci. Sports* 29 (2019) 422–429.
- [9] R.B. Sr D'Agostino, R.S. Vasan, M.J. Pencina, et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study, *Circulation* 117 (2008) 743–753.
- [10] P.W. Wilson, R.B. D'Agostino, D. Levy, et al., Prediction of coronary heart disease using risk factor categories, *Circulation* 97 (1998) 1837–1847.
- [11] A.V. Khera, M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, et al., Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 127–135.
- [12] C.E. Kosmas, G. Christodoulidis, J.W. Cheng, et al., High-density lipoprotein functionality in coronary artery disease, *Am. J. Med. Sci.* 347 (2014) 504–508.
- [13] D.H. van de Kerkhof, D. de Boer, J.H. Thijssen, et al., Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 102–115.
- [14] H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl, et al., Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radic. Res. Commun.* 6 (1989) 67–75.
- [15] S. Abbara, P. Blanke, C.D. Maroules, et al., SCCT guidelines for the performance and acquisition of coronary computed tomographic angiography: a report of the society of cardiovascular computed tomography guidelines committee: endorsed by the north American society for cardiovascular imaging (NASCI), *J. Cardiovasc Comput Tomogr* 10 (2016) 435–449.
- [16] W.P. Castelli, Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease—the Framingham Heart Study, *Can. J. Cardiol.* 4 (1988) Suppl A:5A-10A.
- [17] C.B. Severo, J.P. Ribeiro, D. Umpierre, et al., Increased atherothrombotic markers and endothelial dysfunction in steroid users, *Eur J Prev Cardiol* 20 (2013) 195–201.
- [18] M.R. dos Santos, R.G. Dias, M.C. Laterza, et al., Impaired post exercise heart rate recovery in anabolic steroid users, *Int. J. Sports Med.* 34 (2013) 931–935.
- [19] L.J. Santora, J. Marin, J. Vangrow, et al., Coronary calcification in body builders using anabolic steroids, *Prev. Cardiol.* 9 (2006) 198–201.
- [20] J.L. da Silva, C.G. Vinagre, A.T. Morikawa, et al., Resistance training changes LDL metabolism in normolipidemic subjects: a study with a nanoemulsion mimetic of LDL, *Atherosclerosis* 219 (2011) 532–537.
- [21] K.B. Rubinow, T. Vaisar, C. Tang, et al., Testosterone replacement in hypogonadal men alters the HDL proteome but not HDL cholesterol efflux capacity, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1376–1383.
- [22] S. Motoyama, M. Sarai, H. Harigaya, et al., Computed tomographic angiography characteristics of atherosclerotic plaques subsequently resulting in acute coronary syndrome, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) 49–57.

Material Suplementar – Artigo 1

Resultados

Supplementary Table 1. Cumulative lifetime duration of strength training and AAS use, and types of AAS used by anabolic androgenic steroid users (AASU), anabolic androgenic steroid nonusers (AASNU), and sedentary control (SC).

Variables	AASU (n=20)	AASNU (n=20)	SC (n=10)	p
Strength training (years)	12±5	10±4	-	0.435
AAS use (years)	8±6	-	-	-
<i>Type of AAS (weekly dose)</i>				
Testosterone (mg) ^{††}	575±220	-	-	-
Nandrolone (mg)	630±125	-	-	-
Boldenone (mg)	500±100	-	-	-
Trenbolone (mg)	480±200	-	-	-
Stanozolol (mg)	350±180	-	-	-
T/E ratio	63.8±44.6 * [†]	0.9±1.2	0.9±0.9	0.016

AAS=anabolic androgenic steroids; **T/E**=testosterone/epitestosterone ratio.

^{††}Represents all testosterone derivatives: enanthate, propionate, undecylate, and cypionate. * = p<0.05 vs. SC; [†] = p<0.05 vs. AASNU.

Supplementary Table 2. General cardiovascular risk (Castelli Index and Framingham Heart Study)

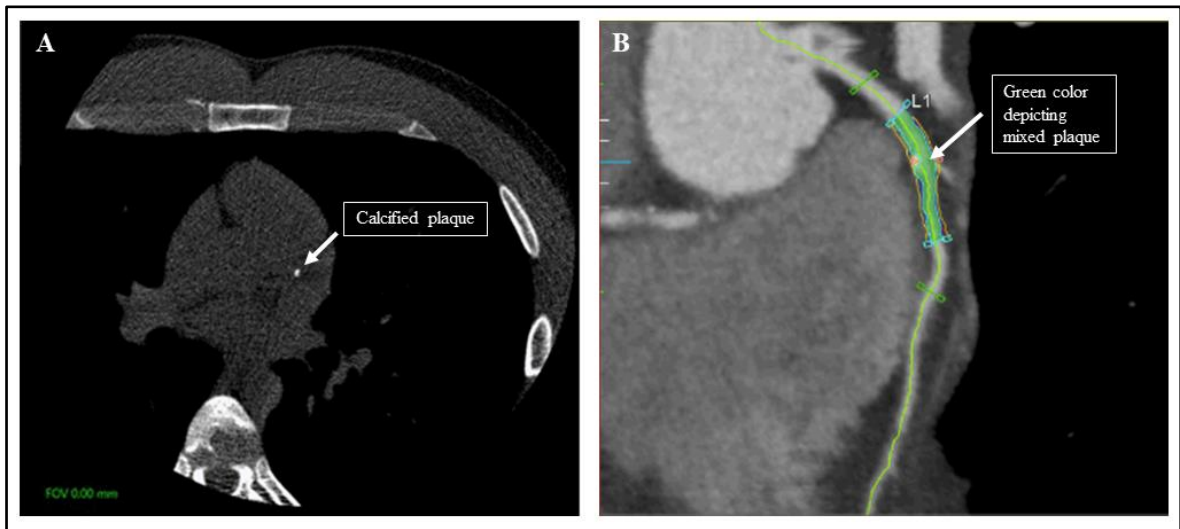
Variables	AASU (n=20)	AASNU (n=20)	SC (n=10)	p
TC/HDL-c ratio	10.4 (6.6-15.7) *†	3.6 (3.1-3.9)	3.8 (3.5-4.7)	<0.001
CVD risk (%)	3.0 (3.0-4.3) *†	1.6 (1.2-2.3)	1.4 (1.1-2.0)	<0.001
Vascular aging (years)	39 (36-43) *†	30 (25-34)	29 (27-32)	<0.001
hs-CRP (mg/L)	1.69 (0.68-2.51) †	0.36 (0.17-0.74)	1.00 (0.26-3.6)	<0.001

Data are presented as mean±SD or median±IQR (25% - 75%; IQR= interquartile range).

TC= total cholesterol, HDL=high-density lipoprotein; CVD=cardiovascular disease; hs-

CRP=high-sensitive C-reactive protein. * =p<0.005 vs SC, † =p<0.05 vs. AASNU.

Supplementary Figure 1A and 1B. Shows calcified plaque in the left anterior descending artery (LAD) in a 27-year-old man AAS user, and a mixed plaque in the LAD in a 43-year-old man AAS user, respectively.



Methods

Determination of cholesterol Efflux Mediated by HDL

Cholesterol efflux was evaluated by ^{14}C -cholesterol efflux mediated by HDL with macrophages cultured cells from mice. Wild-type (WT) C57BL/6Ntac mice were euthanized by intraperitoneal injection of an anesthetic mixture dose (3x the recommended dose for anesthesia) consisting of ketamine hydrochloride (Ketalar® - 50 mg/kg body weight) and xylazine hydrochloride (Rompum®-10 mg/kg body weight). Both hind limbs were dissected with surgical tweezers and scissors for surgical access to the femur and tibia. Then, proximal and distal osteotomy of the femur and tibia was performed. A needle (diameter 0.45 mm, length: 13 mm) and syringe were injected into the bone marrow of each bone, 5 mL of conditioning medium (400 mL of low glucose DMEM + 4 mL of penicillin/streptomycin + 50 mL of fetal bovine serum inactivated + 50 mL of conditioned medium from L929 cells - 25 mL of first week medium with 25 mL of second week medium - item 4.7) to collect as bone marrow cells. Conditioning medium containing cells isolated from the bone marrow was gently aspirated and expelled 5 times using a 20-mL syringe and a size 18 and ½ needle (1.2 mm in diameter and 40 mm in length) to separate the aggregates from the cells. They were centrifuged for 6 min, 1000 rpm at room temperature. The cell pellet was then resuspended in conditioning medium, distributed in a culture dish and incubated for 5 days at 37°C under 5% (v / v) CO₂, to promote differentiation of monocytes into macrophages. On day 5, the environment was changed to a new conditioning medium for 24 hours.

Macrophages were incubated with DMEM (Low Glucose, Gibco, Grand Island, New York, USA) containing 1 mg fatty acid free albumin (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) plus 50 µg acetylated LDL/mL and 0.3 µCi ^{14}C -cholesterol/mL (Amersham Biosciences, UK) for 48h. After careful washing with phosphate buffer (PBS

- NaCl 150 mmol/L, Na₂HPO₄ 20 mmol/L, NaH₂PO₄ 14 mmol/L, NaOH 1 mmol/L - pH 7.4) with FAFA, the cells were treated for 18h with DMEM (1885-084 Life Technologies) + AMPc (8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt) containing FAFA to balance the intracellular pools of cholesterol and radioactive cholesterol. After washing with PBS/FAFA, cells were incubated in the presence or absence of HDL (50 µg/mL) for 8h. The culture medium was collected after centrifugation of the plate at 1500 rpm for 10 min at 4°C, for removal of cell debris and transferred to scintillation vials after addition of counting solution (Perkin Elmer, Turku, Finland). The wells of the dishes were washed with ice-cold physiological solution (4°C) two times. Cells were extracted with hexane: isopropanol solution (3:2) (Merck, Darmstadt, Germany) and the radioactivity determined after evaporation of the solvent. Cells were incubated with 150 µL of 0.2 N NaOH for 3h at room temperature and protein concentration determined by the method of Lowry et al.(1) Cholesterol efflux assays were done in quadruplicate wells in one single experimental batch in order to avoid inter assay variability. In addition, in all plaques a control incubation (in quadruplicate) was carried out in the absence of HDL, as an indicative of the basal efflux (DMEM plus albumin only). The mean value of basal efflux (considering all plaques) was subtracted from the efflux value obtained with the addition of patient's HDL. Then, it was obtained the cholesterol efflux specifically mediated by HDL. The percentage of ¹⁴C-cholesterol efflux was calculated as follow; $14\text{C-cholesterol in medium} / 14\text{C cholesterol in medium} + 14\text{C cholesterol in cells} \times 100$

HDL Antioxidant Capacity

Low-density lipoproteins (LDL), isolated from a pool of healthy human plasma donors, were dialyzed against PBS without EDTA and then diluted to obtain a concentration of 40 mg of LDL protein in 500 µL of deionized H₂O. After that, 80 µg of

HDL protein was added, followed by 1 mL of 10 mmol/L CuSO₄ solution (final concentration) at 37°C. The blank tube consisted of LDL and copper incubation only. The kinetics of conjugated diene formation was determined by the variation in absorbance, monitored continuously at 234 nm for 4h at 3-min intervals. The time (min) of LDL resistance to oxidation (lag time) was calculated between the start of the reaction and the intersection of time with the extrapolated line of the propagation phase, and the maximum rate of conjugated diene formation determined by maximum absorbance/min.(2) The LDL oxidation lag time represents the time at which these lipoproteins resist oxidation and is determined by the point where the linear increase in absorbance intersects with the time line. The higher the lag time, the longer the LDL will resist oxidation. On the other hand, the maximum ratio of conjugated diene formation is represented by the division of the maximum absorbance by the time it occurred. The lower this value, the slower the production of conjugated dienes in LDL.(3)

Coronary Computed Tomography Angiography Image Acquisition

To assess coronary artery plaque and calcification, all participants underwent coronary computed tomography angiography according to the guidelines of the Society of Cardiovascular Computed Tomography (SCCT).(4) All CT scans were acquired in a 320-row detector scanner (AquilionOne™ – Toshiba Medical Systems Corporation, Otawara, Japan) with 0.5-mm thick slices. Acquisition protocol included coronary artery calcium scoring (CACS) and coronary CTA. CACS protocol utilized a 370-ms tube rotation, 120-kV tube voltage, 300-mA tube current, and 320x0.5-mm collimation with 3-mm slice thickness reconstructed images, one heart beat acquisition during diastole. Coronary plaque was defined as any discernible structure that could be assigned to the coronary artery wall on at least two orthogonal planes; the number of coronary artery

segments with plaque was determined using a 17-segment model.⁽⁵⁾ Semi-automated coronary plaque volume measurements were made using a specialized tool (SurePlaque) within a Vitrea workstation (Vital Images, Inc, Minnetonka, MN, US). The workstation generated a centerline through the coronary artery lumen. The plaque length was established visually with markers at its proximal and distal extent. The inner luminal and outer wall coronary artery contours were automatically generated by the software and manually edited as necessary; these voxels defined the coronary artery plaque volume in mm³. This volumetric technique for coronary plaque measurement has previously demonstrated excellent intra- and inter-observer reproducibility.⁽⁶⁾ Total amount of plaque is the total plaque volume, where the proximal to distal limits of the plaque are visually defined by the user. These limits are visually defined as tissue structure > 1mm² that is contained within and/or adjacent to the coronary artery lumen and can be clearly distinguished from the vessel lumen.⁽⁷⁾ (8) (9) After plaque selection the SurePlaque tool automatically classifies the plaque components within the coronary wall based on pixels density in Hounsfield units (HU), and according to the following thresholds: lipidic component: from - 100 to 49 HU; fibrotic component: from 50 to 149 HU; and calcium component: above 149 HU.⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ Finally, the software tool provides total and each component plaque volumes measured in cubic millimeters as well as their mean density and standard deviation in HU.

Prior to CTA, an 18- or 20-gauge antecubital intravenous (IV) catheter was placed. The participant was placed on ECG monitoring. Adequate acquisition depends on heart rate control, achieved with the use of beta-blockers if heart rate >60 bpm, according to participant tolerance and blood pressure. Inspiratory breath-hold was performed during image acquisition. A dose of 5 mg of sublingual isosorbide nitrate was given for coronary vasodilation immediately before coronary CT angiography. Contrast injection based on

BMI, ranging from 70 to 100 mL (Iopromide 370, Ultravist Bayer or Iopamidol 370 g/cm³, Bracco), was administered through an automated injector at a rate of 5 mL/s, followed by a 40-cc normal saline flush.

Typically, coronary CTA image acquisition occurred within one single heart beat (less than 65 bpm) according to a retrospectively ECG-triggered protocol and during inspiratory breath-hold.(11, 12) Coronary CTA acquisition parameters depended on participants' BMI: up to 23 kg/m², tube voltage of 100kV and tube current of 450-550mA; from 24 to 39 kg/m², 120kV and 400-580mA; for greater than 40kg/m² 135kV and 510mA. Collimation depended on longitudinal size of the heart and varied from 120 to 160mm, with 0.5-mm thick slice acquisitions (240x0.5mm to 320x0.5mm). CTA images were reconstructed with a slice thickness of 0.5 mm with a 0.3 mm overlap using a filtered back projection kernel at 5% intervals from 60-85% of the R-R interval for coronary evaluation. Image reconstruction was performed with a small field of view of ≤ 20 cm to maximize spatial resolution. The cardiac phase or phases that minimized motion or other artifacts were used for the analysis.

The mean estimated radiation dose per participant was 4-6 mSv (320 detector-row), considered as a low-dose.(4, 13) Blinded image analysis was performed of AAS use and all other clinical data on dedicated 3D workstations. The coronary artery calcium score (CACS) was calculated from the noncontrast images using the method of Agatston, and all other coronary CT angiography analyses were performed on a dedicated VitreaTM CORE workstation (Vital Images Inc, Plymouth, MN, EUA).(14) Coronary artery stenosis, the number of coronary artery segments with visible coronary plaque, and coronary artery plaque volume was assessed. Each participant's worst coronary artery stenosis was categorized as none, <30%, 30-50%, 51-70%, 71-99%, and 100% by visual inspection of two evaluators. Coronary plaque was defined as any discernable structure

that could be assigned to the coronary artery wall on at least two orthogonal planes; the number of coronary artery segments with plaque was determined using a 17-segment model.(5) Semi-automated coronary plaque volume measurements were made using a specialized tool (SurePlaque) within a Vitrea workstation. The workstation generated a centerline through the coronary artery lumen. The plaque length was established visually with markers at its proximal and distal extent. The inner luminal and outer wall coronary artery contours were automatically generated by the software and manually edited as necessary; these voxels defined the coronary artery plaque volume in mm³. This volumetric technique for coronary plaque measurement has previously demonstrated excellent intra- and interobserver reproducibility.(6)

General cardiovascular risk

To assess the clinical cardiovascular risk score, we used the Castelli Index to assess the risk of development of coronary artery disease (CAD)(15) and Framingham Heart Study Score that predicts risk of specific atherosclerotic cardiovascular disease (CVD risk).(16) The Castelli Index was calculated by ratio of total cholesterol:HDL concentration (TC/HDL ratio).(15) Framingham Heart Study score was calculated through the sex-specific multivariable risk factor algorithm. In this algorithm, we included sex, age, total cholesterol, HDL, and systolic blood pressure (measured by the auscultatory method). After including all these variables, this algorithm creates points, which calculate the percentage of the CVD risk within 10 years. Furthermore, the vascular aging was calculated through Heart Age/Vascular Age (HA/VA) as proposed by Framingham Heart Study.(16)

References


1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
2. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989;6(1):67-75.
3. Ribeiro IC, Iborra RT, Neves MQ et al. HDL atheroprotection by aerobic exercise training in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(5):779-86.
4. Abbara S, Blanke P, Maroules CD et al. SCCT guidelines for the performance and acquisition of coronary computed tomographic angiography: A report of the society of Cardiovascular Computed Tomography Guidelines Committee: Endorsed by the North American Society for Cardiovascular Imaging (NASCI). *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2016;10(6):435-49.
5. Raff GL, Abidov A, Achenbach S et al. SCCT guidelines for the interpretation and reporting of coronary computed tomographic angiography. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2009;3(2):122-36.
6. Maurovich-Horvat P, Ferencik M, Voros S, Merkely B, Hoffmann U. Comprehensive plaque assessment by coronary CT angiography. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(7):390-402.
7. Rassi CH, Churchill TW, Tavares CA et al. Use of imaging and clinical data to screen for cardiovascular disease in asymptomatic diabetics. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:28.
8. Leber AW, Knez A, Becker A et al. Accuracy of multidetector spiral computed tomography in identifying and differentiating the composition of coronary

- atherosclerotic plaques: a comparative study with intracoronary ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(7):1241-7.
9. Maurovich-Horvat P, Ferencik M, Bamberg F, Hoffmann U. Methods of plaque quantification and characterization by cardiac computed tomography. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2009;3 Suppl 2:S91-8.
 10. Motoyama S, Sarai M, Harigaya H et al. Computed tomographic angiography characteristics of atherosclerotic plaques subsequently resulting in acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(1):49-57.
 11. Dewey M, Zimmermann E, Deissenrieder F et al. Noninvasive coronary angiography by 320-row computed tomography with lower radiation exposure and maintained diagnostic accuracy: comparison of results with cardiac catheterization in a head-to-head pilot investigation. *Circulation.* 2009;120(10):867-75.
 12. Nasis A, Leung MC, Antonis PR et al. Diagnostic accuracy of noninvasive coronary angiography with 320-detector row computed tomography. *Am J Cardiol.* 2010;106(10):1429-35.
 13. Fazel R, Krumholz HM, Wang Y et al. Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures. *N Engl J Med.* 2009;361(9):849-57.
 14. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Jr., Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15(4):827-32.
 15. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol.* 1988;4 Suppl A:5A-10A.

16. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.

ORIGINAL ARTICLE

Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users

Francis Ribeiro de Souza¹  | Allan Robson Kluser Sales¹ | Marcelo Rodrigues Dos Santos¹ | Rafael Armani Porello¹ | Guilherme Wesley Peixoto da Fonseca¹ | Ana Luiza Carrari Sayegh¹ | Antonio Carlos Battaglia Filho¹ | Rosa Maria Rodrigues Pereira² | Liliam Takayama² | Tiago Franco de Oliveira³ | Mauricio Yonamine⁴ | Carlos Eduardo Negrão¹ | Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves¹

¹Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

²Bone Laboratory Metabolism, Rheumatology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

³Pharmacoscience Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toxicology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence

Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil.

Email: janieire.alves@incor.usp.br

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant/Award Number: FAPESP 2012/10527-3

[Correction added on 7 December 2018, after first online publication: The panel A in figure 1 has been updated.]

Disturbed shear rate (SR), characterized by increased retrograde and oscillatory SR in the brachial artery, is associated with inflammation, atherosclerosis, endothelial dysfunction, and sympathetic hyperactivity. Young subjects do not have disturbed SR; however, elderly subjects do, which seems to be associated with sympathetic hyperactivity. Anabolic androgenic steroids (AAS) abuse in young is associated with increased muscle sympathetic nerve activity (MSNA). We hypothesized that AAS users might have disturbed SR. We tested the association between retrograde and oscillatory SR with MSNA. In addition, we measured the high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). We evaluated 10 male AAS users, age 27 ± 4 years, and 10 age-matched AAS nonusers, age 29 ± 5 years. At rest, retrograde and oscillatory SR were evaluated by Doppler ultrasound, MSNA was measured with microneurography, and hs-CRP was measured in blood sample. Flow-mediated dilation (FMD) was also assessed. AAS users had higher retrograde SR (24.42 ± 17.25 vs 9.15 ± 6.62 s⁻¹, $P = 0.01$), oscillatory SR (0.22 ± 0.13 vs 0.09 ± 0.07 au $P = 0.01$), and MSNA (42 ± 9 vs 32 ± 4 bursts/100 heart beats, $P = 0.018$) than nonusers. MSNA (bursts/100 heart beats) was correlated with retrograde SR ($r = 0.50$, $P = 0.050$) and oscillatory SR ($r = 0.51$, $P = 0.042$). AAS users had higher hs-CRP [1.17 (0.44 - 3.63) vs 0.29 (0.17 - 0.70) mg/L, $P = 0.015$] and decreased FMD (6.42 ± 2.07 vs $8.28\% \pm 1.53\%$, $P = 0.035$) than nonusers. In conclusion, AAS abuse is associated with retrograde and oscillatory SR which were associated with augmented sympathetic outflow. In addition, AAS seems to lead to inflammation characterized by increased hs-CRP. These alterations may have the potential of increasing the early risk of atherosclerotic disease in young AAS users.

KEYWORDS

anabolic steroid, muscle sympathetic nervous activity, retrograde shear rate

1 | INTRODUCTION

Shear rate (SR) is an important mechanical factor that contributes to the control of blood flow and endothelial function.¹ However, disturbed SR, characterized by increased retrograde and oscillatory SR, favors a pro-atherogenic endothelial cell phenotype associated with endothelial dysfunction.^{1,2} A study of elderly individuals provides evidence of increased retrograde and oscillatory SR, which seems to be associated with increased muscle sympathetic nerve activity (MSNA) and reduced nitric oxide bioavailability.⁴

Anabolic androgenic steroids (AAS) have been used as an illicit source linked to skeletal muscle hypertrophy and performance.⁵ However, AAS abuse is associated with autonomic dysfunction. Previously, it was demonstrated that AAS users have increased MSNA and lower forearm blood flow measured by venous occlusion plethysmography.⁶ Moreover, endothelial dysfunction seems to be present in AAS users, because they have blunted flow-mediated dilation (FMD).⁷

Increased retrograde SR promotes secretion of factors that contribute to inflammation processes leading to the development of atherosclerotic disease.¹ Curiously, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), which is associated with a higher risk of future cardiovascular events in the general population,⁸ is significantly increased in AAS users.⁷ Thus, it is possible to speculate that the disturbed SR could lead to vascular inflammation in young AAS users; the increased sympathetic outflow might be one of the mechanisms involved in this vascular disturbance. However, the association between disturbed SR, MSNA, and inflammation in AAS users is unknown.

Based on these assumptions, we hypothesized that young AAS users might have increased retrograde and oscillatory SR. Furthermore, these alterations could be associated with MSNA and hs-CRP.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Subjects

The local Human Subject Protection Committee approved this cross-sectional study under the number 3945/13/070. Ten male AAS users (AASU) and 10 male AAS nonusers (AASNU) 18-40 years of age were invited to participate. All participants (AASU and AASNU) were recreational weightlifters or amateur bodybuilding athletes who were recruited from gymnasiums. Anamnesis was performed in all participants to obtain information about their physical activity status, AAS administration, medications, and sports supplements. All individuals had been involved in strength training for at least 2 years. AASUs should be self-administering AAS in periodic cycles lasting from 8 to 12 weeks for at least

2 years with 2-4 cycles per year. All AASUs were on a cycle over the course of the study. Exclusion criteria for all participants were smoking, alcohol consumption, use of diuretic and/or antihypertensive medications, and liver and kidney disease.

2.2 | Measures and procedures

All participants signed a written informed consent. The evaluations were performed on two consecutive days. On the first day, a blood sample was drawn and body composition was measured. On the next day, blood pressure, heart rate, MSNA, and vascular measurements were assessed. On both days, all participants abstained from sports supplements, caffeine-containing products, and exercise training for 48 hours.

2.3 | Blood measures

Blood sample was collected in the morning (between 8:00 and 10:00 AM) after 12 hours of fasting and after 30 minutes of resting for lipid assessment (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides), glucose, and hs-CRP.

2.4 | Body composition

Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), (Discovery DXA system, Hologic Inc) to measure total fat-free mass, fat mass, and fat percentage in all participants. DXA was used to exclude possible bias of body mass index (BMI) between AASU and AASNU.

2.5 | Blood pressure and heart rate

Blood pressure and heart rate were recorded after 10 minutes of rest in a quiet, temperature-controlled (21°C) room in the morning at approximately the same time each day. Arterial blood pressure was measured using the auscultatory method with the participant in a seated position. Heart rate was measured through 12 derivative electrocardiograms with the participant in the supine position.

2.6 | Muscle sympathetic nerve activity

After blood pressure and heart rate measurements, the MSNA was recorded directly from the fibular nerve using the microneurography technique. A tungsten microelectrode was placed in the peroneal nerve, and a sympathetic neurogram was recorded. Nerve signals were amplified by a factor of 50 000 to 100 000 and band-pass filtered (700-2000 Hz). For recording and analysis, nerve activity was rectified and integrated (time constant, 0.1 second) to obtain a mean voltage display. MSNA was expressed as burst frequency (in bursts

per minute) and burst incidence (in bursts per 100 heart beats). All MSNA recordings met previously established and described criteria.⁶

2.7 | Brachial artery imaging

After the MSNA technique, the participants rested for 15 minutes. Under supine resting conditions, the brachial artery images (2–12 cm above the antecubital fossa) were obtained through duplex mode, and ultrasound equipment (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway) equipped with a 13 MHz linear probe. The left arm was positioned with the shoulder abducted at approximately 80° and the forearm supinated. The contrast resolution, depth, and gain were adjusted to optimize the longitudinal images of the lumen/arterial wall interface. Brachial artery diameter and insonation angle-corrected ($\leq 60^\circ$) blood velocity spectra were simultaneously recorded via the pulsed-wave mode at linear frequencies of 13 and 6.0 MHz, respectively. The probe location was marked on the skin and did not change position throughout the study. The sample volume was located at the center of the brachial artery and then adjusted to cover the vessel width. Diameter and blood velocity waveforms were continuously recorded for a 3-minute period.

2.8 | Flow-mediated dilation (FMD)

Before starting the reactive hyperemia, the participants rested for 10 minutes in a supine position. Brachial artery FMD was then evaluated in the left arm, with the shoulder abducted at approximately 80° and the forearm supinated. An appropriate-sized rapid inflation/deflation pneumatic cuff (E-20 Rapid Cuff Inflator, DE Hokanson) was placed around the left forearm, immediately distal to the olecranon process. For the evaluation of FMD, the same ultrasound equipment of SR patterns was used (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway). Baseline diameter and blood velocity waveforms were continuously recorded over 60 seconds. Reactive hyperemia was assessed immediately after relief of 5 minutes of total ischemia, which was induced by external compression of the arm using an inflatable cuff at 250 mm Hg. After this period, the cuff was rapidly deflated, and the changes in artery diameters from baseline were expressed as percentages.

2.9 | FMD and shear rate analysis

The Doppler ultrasound video signal was real-time encoded and captured at a frequency of 30 Hz. The video files were compatible with commercial automated edge-detection and wall-tracking software (Cardiovascular Suite, FMD Studio, Quiposrl), which was used for offline analysis. The initial phase of the software analysis consisted of identifying regions of interest on the optimal portion of

the brachial artery image and its blood velocity spectra. R-wave gating function was applied to continuously assess brachial artery diameter or blood velocity. Brachial artery diameter was calculated by an average of 3 seconds. FMD was calculated as the percentage rise of this peak diameter from the preceding baseline diameter. We also performed the allometric modeling solution proposed by Atkinson et al.⁹ SR was calculated as four times the ratio between mean blood velocity (V_{mean} ; in cm/s) and artery diameter (in cm) [ie, $\text{SR} = 4 \times (V_{\text{mean}}/\text{diameter})$]. For calculations of antegrade and retrograde SR, antegrade and retrograde mean blood velocities were used, respectively. In addition, oscillatory SR index, a variable that estimates the magnitude of oscillation in the vascular bed was calculated as $(\text{IRetrograde shearI}/(\text{IAntegrade shearI} + \text{IRetrograde shearI}))$. Oscillatory SR index values range from 0 to 0.5, with 0 corresponding to unidirectional shear throughout the cardiac cycle, and 0.5 representing pure oscillation with time-average shear equal to 0. Oscillatory SR is expressed in arbitrary units (au). After deflation of the cuff, the cumulative SR was determined by a 3-minute period through the area under the curve (AUC; s^{-1}). An additional experiment on FMD reliability revealed high levels of intersession reproducibility ($n = 10$, FMD intraclass correlation coefficient 0.92 [95%CI 0.83–0.979]).

2.10 | Doping urine test

Doping urine test was performed with ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (UPLC-MS/MS) in both groups to document the presence of AAS. In addition, the testosterone/epitestosterone (T/E) concentration ratio in the urine was obtained as previously reported.¹⁰ A T/E ratio greater than 6 indicates testosterone abuse.¹¹

In addition, cocaine, tetrahydrocannabinol (THC), amphetamine/methamphetamine, methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) were tested in the urine by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis as previously described.¹²

2.11 | Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SD or median (interquartile range [IQR] 25%–75%). Normality (Shapiro-Wilk) test was conducted to determine the distribution of the data. Possible differences between groups were analyzed using an unpaired Student *t* test and Mann-Whitney-Wilcoxon test for parametric or nonparametric data. Spearman's correlation coefficient was used to test the correlation between MSNA and retrograde SR, MSNA and oscillatory SR, and hs-CRP levels with retrograde SR $P < 0.05$ were considered statistically significant.

TABLE 1 Physical, hemodynamic, lipids profile, biomarkers, and autonomic characteristics in anabolic androgenic steroids users (AASU) and anabolic androgenic steroids nonusers (AASNU)

Variables	AASU (n = 10)	AASNU (n = 10)	P
Age (years)	27 ± 4	29 ± 5	0.295
Weight (kg)	100.6 ± 12.2	79.9 ± 10.1	<0.001
Height (m)	1.77 ± 0.04	1.78 ± 0.08	0.891
Body mass index (kg.m ⁻²)	32.07 ± 3.47	25.34 ± 2.25	<0.001
Fat percentage (%)	14.2 ± 6.3	18.8 ± 4.7	0.111
Lean Mass (kg)	82.3 ± 8.0	61.4 ± 7.9	<0.001
HR (beats/min)	77 ± 11	57 ± 8	0.002
SBP (mm Hg)	130 (130-140)	110 (100-120)	0.001
DBP (mm Hg)	80 (80-90)	70 (68-80)	0.009
MBP (mm Hg)	100 (97-103)	84 (78-93)	0.001
Total cholesterol (mg/dL ⁻¹)	194 ± 54	159 ± 26	0.079
LDL cholesterol (mg/dL ⁻¹)	166 ± 52	96 ± 17	<0.001
HDL cholesterol (mg/dL ⁻¹)	14 (12-18)	44 (41-60)	<0.001
Triglycerides (mg/dL ⁻¹)	61 (55-103)	71 (52-78)	0.966
hs-PCR (mg/L)	1.17(0.44-3.63)	0.29 (0.17-0.70)	0.015
MSNA (bursts/min)	32 ± 3	19 ± 1	<0.001
MSNA (bursts/100 heartbeats)	42 ± 9	32 ± 4	0.018

Data are presented as mean ± SD or median ± IQR (25%-75%; IQR = interquartile range).

DBP, diastolic blood pressure; HDL, high density lipoprotein; HR, heart rate; hs-PCR, high-sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein; MBP, mean blood pressure; MSNA, muscle sympathetic nerve activity; SBP, systolic blood pressure.

3 | RESULTS

The doping control assessment was negative in the AASNU group (mean T/E lower than 1). In contrast, nandrolone decanoate, boldenone undecylenate, testosterone, and stanozolol were found in the AASU group. Furthermore, the mean T/E concentration ratio in the urine was 50.75 ± 24.46 . The lifetime years of AAS use was 5 ± 3 years. The drug test assessment was positive to MDMA and amphetamine for one participant in the AASU group, and positive to cocaine for one participant in the AASNU group. In addition, both groups had similar lifetime years of resistance training (10 ± 4 vs 10 ± 4 years, $P = 0.90$).

The physical characteristics, hemodynamics, lipid profiles, biomarkers, and autonomic characteristics are shown in Table 1. No significant differences were found between AASU and AASNU in age, height, and fat percentage ($P > 0.05$). However, AASU had greater weight, body mass index, and lean mass compared with AASNU ($P < 0.05$). AASU had higher heart rate, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, mean blood pressure, LDL cholesterol, hs-PCR, MSNA (bursts/min), and MSNA (bursts/100 heartbeats) compared with AASNU

($P < 0.05$). However, no significant differences existed between AASU and AASNU for total cholesterol and triglycerides ($P > 0.05$).

Brachial artery characteristics at rest are shown in Table 2. AASU had higher resting diameter, peak diameter retrograde velocity compared with AASNU ($P < 0.05$). In contrast, FMD and allometrically scaled FMD were reduced in AASU compared with AASNU ($P < 0.05$). No significant differences were found between AASU and AASNU for time to peak, SR_{AUC}, anterograde velocity, anterograde SR, and mean SR ($P > 0.05$).

As illustrated in Figure 1, AASU had higher retrograde SR (24.42 ± 17.25 vs 9.15 ± 6.62 s⁻¹, $P = 0.01$; Panel A) and oscillatory SR (0.22 ± 0.13 vs 0.09 ± 0.07 au; $P = 0.01$; Panel B) than AASNU. An example of SR in the brachial artery in one AASU and one AASNU is shown in Figure 1C and D, respectively.

Further analysis showed a significant correlation between retrograde SR and MSNA (bursts/100 heartbeats) (Figure 2A); oscillatory SR and MSNA (bursts/100 heartbeats) (Figure 2B). However, no significant correlation between retrograde and oscillatory SR with FMD was found (Table 3; $P > 0.05$).

Variables	AASU (n = 10)	AASNU (n = 10)	P
Resting diameter (mm)	4.8 ± 0.28	3.9 ± 0.22	<0.001
Peak diameter (mm)	5.1 ± 0.28	4.3 ± 0.26	<0.001
Time to peak (s)	66.13 ± 41.07	60.83 ± 42.21	0.817
FMD (%)	6.42 ± 2.07	8.28 ± 1.53	0.035
Allometrically scaled FMD (%)	6.91 ± 2.37	9.05 ± 1.82	0.036
SR _{AUC} (s)10 ³	35.41 ± 8.45	31.35 ± 11.20	0.721
Retrograde velocity (cm/s)	-2.94 ± 1.97	-0.89 ± 0.65	0.005
Anterograde velocity (cm/s)	10.95 ± 3.36	10.39 ± 3.58	0.722
Anterograde SR (s ⁻¹)	90.36 ± 28.56	106.12 ± 37.21	0.302
Mean SR (s ⁻¹)	65.94 ± 38.30	96.97 ± 41.18	0.098

TABLE 2 Brachial artery characteristics in anabolic androgenic steroids users (AASU) and anabolic androgenic steroids nonusers (AASNU)

Data are presented as mean ± SD.

FMD, flow-mediated dilatation; SR_{AUC}, shear rate area under the curve, SR, shear rate.

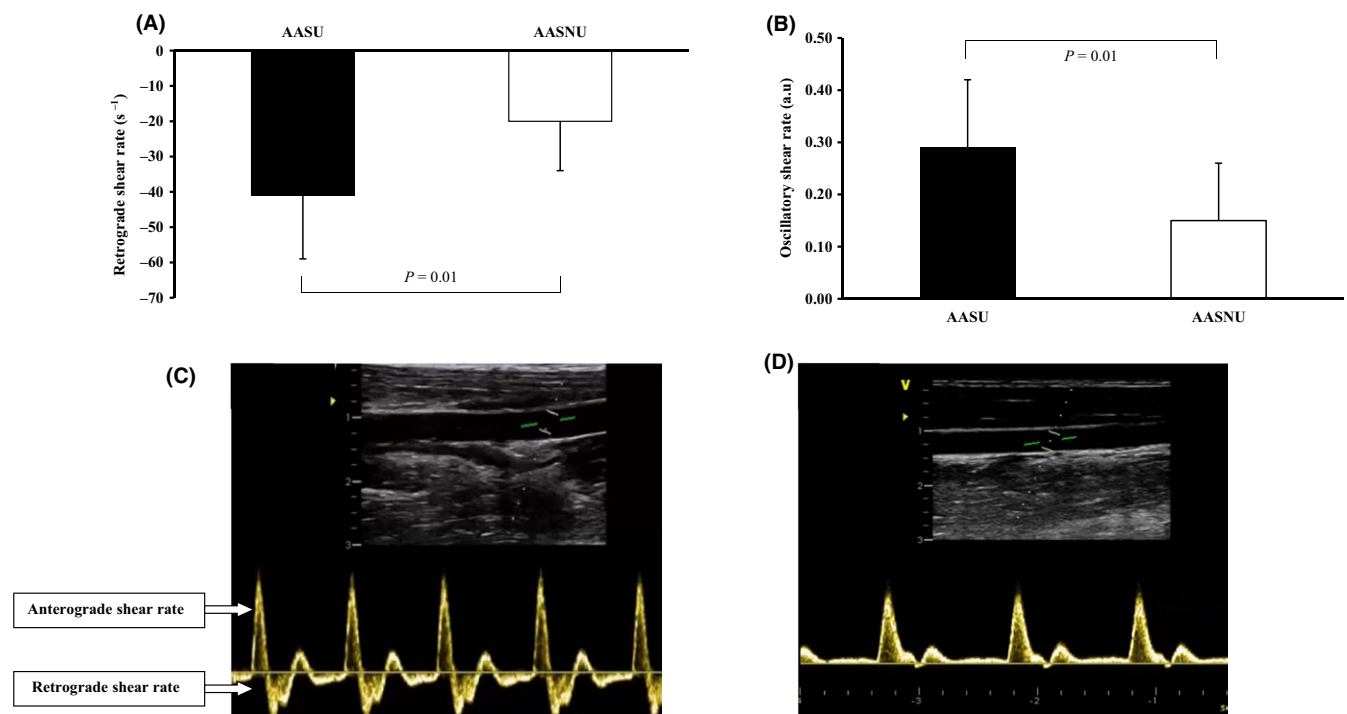


FIGURE 1 Retrograde SR (A) and Oscillatory SR (B) in AAS users and AAS nonusers. Example of SR in the brachial artery in the AASU group (C) and in the AASNU group (D)

Similarly, no significant correlation between retrograde and oscillatory SR with hs-CRP was found (Table 3; $P > 0.05$).

4 | DISCUSSION

The main and new findings of the present study are as follows: (a) AAS users have increased retrograde and oscillatory SR in the brachial artery compared with AASNU; and (b) both retrograde and oscillatory SR are associated with increased MSNA.

The clinical impact of these results is noteworthy. Disturbed SR has been documented in elderly populations, in whom vascular dysfunction is expected, but not in a young population.¹³ Interestingly, our study highlights early vascular alterations in young individuals who abuse AAS. However, the underlying mechanisms that may explain this alteration are still unclear. For instance, several studies suggest that an increase in MSNA and/or a decrease in bioavailability of nitric oxide may justify this pathophysiological phenomenon in the aging process.^{14,15} In fact, a previous study showed that MSNA was increased in AAS users.⁶ This finding is also

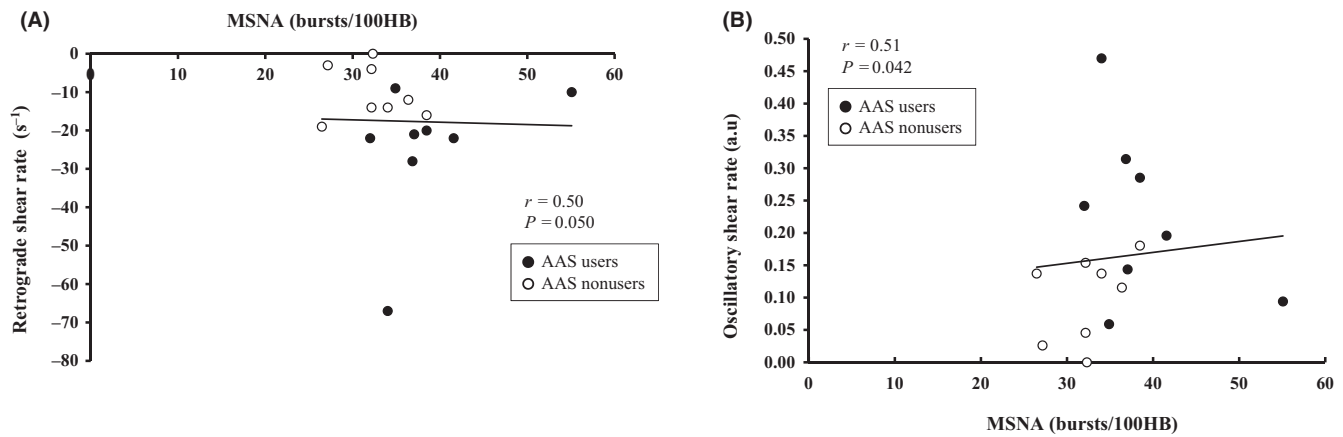


FIGURE 2 Positive linear correlation between retrograde SR and MSNA (A) (MSNA, AAS users $n = 8$ and AAS nonusers $n = 8$), Oscillatory SR and MSNA (B) in AAS users and AAS nonusers

TABLE 3 Correlation between retrograde and oscillatory SR, FMD, allometrically scaled FMD and hs-CRP

Variables	r	P
Retrograde SR and FMD	0.173	0.466
Retrograde SR and allometrically scaled FMD	0.173	0.466
Oscillatory SR and FMD	-0.244	0.300
Oscillatory SR and allometrically scaled FMD	-0.244	0.300
Retrograde SR and hs-CRP	-0.188	0.427
Oscillatory SR and hs-CRP	0.217	0.357

FMD, flow-mediated dilatation; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; SR, shear rate.

confirmed in the present study, in a subgroup of participants. More interestingly, a positive correlation between retrograde SR and MSNA in bursts/100 heart beats ($r = 0.50$, $P = 0.050$; Figure 2A) and oscillatory SR and MSNA in bursts/100 heart beats was found ($r = 0.51$, $P = 0.042$; Figure 2B).

Cell culture and isolated perfused artery studies have demonstrated that unidirectional SR stimulates anti-atherogenic gene expression and inhibits atherogenic gene expression.^{16,17} In contrast, exposure of endothelial cells to increased oscillatory SR promotes a pro-atherogenic phenotype.¹⁸ In our study, compared with AAS nonusers, AAS users had a twofold increase in oscillatory SR. We recognize that the mechanisms of this alteration and their relationship with atherosclerosis need further investigation. However, this alteration seems to be in line with post-mortem studies, which suggest that sudden cardiac death in athletes who abuse AAS is due to coronary artery disease.¹⁹ In fact, in a recent study of men between 34 and 54 years of age, long-term AAS accelerated coronary atherosclerosis, and the lifetime AAS dose was strongly associated with coronary atherosclerotic burden.²⁰

Interestingly, as well as oscillatory SR, retrograde SR is also associated with endothelial dysfunction.²¹ Thijssen and collaborators showed blunted FMD after 30 minutes of dose-dependent increase in retrograde SR by using cuff inflation in

healthy men.²¹ We observed decreased FMD and allometrically scaled FMD in the brachial artery at rest in AAS users. However, no correlation between retrograde SR and FMD and retrograde SR and allometrically scaled FMD was found (Table 3).

Grace and Davies in a short report showed higher CRP levels in AAS users.²² Similarly, Severo and colleagues also showed that AAS users have elevated levels of hs-CRP.⁷ CRP is an inflammatory marker and a strong predictor of cardiovascular events in the general population.²³ In addition, hs-CRP is a marker of vascular wall inflammation with a high sensitivity for predicting coronary events.²⁴ In the present study, we also observed increased hs-CRP levels in AAS users, which ranked them at moderate cardiovascular risk.²⁵ However, no correlation between retrograde and oscillatory SR and hs-CRP was found. Higher hs-CRP is observed in obese when compared with lean subjects.²⁶ In the present study, although AASU present higher body weight, which could be associated with increased hs-CRP, we found no correlation between hs-CRP and fat mass ($r = -0.061$, $P = 0.798$), hs-CRP and lean mass ($r = 0.345$, $P = 0.150$), and hs-CRP and weight ($r = 0.345$, $P = 0.136$).

In conclusion, AAS abuse may increase retrograde and oscillatory SR which were associated with increased MSNA.

In addition, AAS users have higher inflammatory profile characterized by increased hs-CRP. All these alterations may expose young AAS users to the early risk of atherosclerotic disease.

4.1 | Limitations

We recognize potential limitations of our study. Polypharmacy among AASU is often associated with AAS use.²⁷ Therefore, we assessed several drugs as described previously; however, we did not evaluate others non-AAS substances such as heroin, alcohol, and clenbuterol, which could also lead to adverse effect. We studied a small sample size for generalizable inferences of the harms of AAS use. Our study is descriptive and correlational, and therefore it does not allow us to be conclusive regarding the mechanisms proposed. We measured the SR pattern in the brachial artery, but we do not know its influence in the femoral artery. Although the brachial artery is a resistant vascular bed to the development of atherosclerosis, a previous study showed that both brachial and femoral arteries demonstrated a similar relationship between changes in retrograde SR.³ MSNA was measured only in a subgroup of participants, and the mechanism involved between sympathetic outflow and vascular shear rate deserves more study.

4.2 | Perspective

Our study indicates that young individuals under AAS abuse have impaired brachial artery retrograde and oscillatory SR, which are associated with increased MSNA. Therefore, these findings are clinically relevant because it suggests that young AAS users may be at risk of early development of atherosclerotic cardiovascular disease. Future studies using intra-arterial drugs infusions are needed to elucidate the role of sympathetic activity and inflammation on endothelial function in AAS users.

CONFLICT OF INTEREST

None to declare.

ORCID

Francis Ribeiro Souza  <https://orcid.org/0000-0001-8709-8706>

REFERENCES

- Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:677-685.
- McNally JS, Davis ME, Giddens DP, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2290-H2297.
- Schreuder TH, Green DJ, Hopman MT, Thijssen DH. Acute impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in humans. *Physiol Rep.* 2014;2:e00193.
- Casey DP, Padilla J, Joyner MJ. alpha-adrenergic vasoconstriction contributes to the age-related increase in conduit artery retrograde and oscillatory shear. *Hypertension.* 2012;60:1016-1022.
- Forbes GB. The effect of anabolic steroids on lean body mass: the dose response curve. *Metabolism.* 1985;34:571-573.
- Alves MJ, Dos Santos MR, Dias RG, et al. Abnormal neurovascular control in anabolic androgenic steroids users. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42:865-871.
- Severo CB, Ribeiro JP, Umpierre D, et al. Increased atherothrombotic markers and endothelial dysfunction in steroid users. *Eur J Prev Cardiol.* 2013;20:195-201.
- Soeki T, Sata M. Inflammatory Biomarkers and Atherosclerosis. *Int Heart J.* 2016;57:134-139.
- Atkinson G, Batterham AM, Thijssen DH, Green DJ. A new approach to improve the specificity of flow-mediated dilation for indicating endothelial function in cardiovascular research. *J Hypertens.* 2013;31:287-291.
- de Campos DR, Yonamine M, Alves M, de Moraes Moreau RL. Determinação de esteróides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2005;41:467-476.
- van de Kerkhof DH, de Boer D, Thijssen JH, Maes RA. Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis. *J Anal Toxicol.* 2000;24:102-115.
- Mantovani CC, Silva J, Forster G, Almeida RM, Diniz E, Yonamine M. Simultaneous accelerated solvent extraction and hydrolysis of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide in meconium samples for gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1074-1075:1-7.
- Padilla J, Simmons GH, Fadel PJ, Laughlin MH, Joyner MJ, Casey DP. Impact of aging on conduit artery retrograde and oscillatory shear at rest and during exercise: role of nitric oxide. *Hypertension.* 2011;57:484-489.
- Trinity JD, Groot HJ, Layec G, Rossman MJ, Ives SJ, Richardson RS. Impact of age and body position on the contribution of nitric oxide to femoral artery shear rate: implications for atherosclerosis. *Hypertension.* 2014;63:1019-1025.
- Young CN, Deo SH, Padilla J, Laughlin MH, Fadel PJ. Pro-atherogenic shear rate patterns in the femoral artery of healthy older adults. *Atherosclerosis.* 2010;211:390-392.
- Conway DE, Williams MR, Eskin SG, McIntire LV. Endothelial cell responses to atheroprone flow are driven by two separate flow components: low time-average shear stress and fluid flow reversal. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H367-H374.
- Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6:16-26.
- De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox

- state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res.* 1998;82:1094-1101.
19. Frati P, Busardo FP, Cipolloni L, Dominicis ED, Fineschi V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) related deaths: autptic, histopathological and toxicological findings. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13:146-159.
 20. Baggish AL, Weiner RB, Kanayama G, et al. Cardiovascular toxicity of illicit anabolic-androgenic steroid use. *Circulation.* 2017;135:1991-2002.
 21. Thijssen DH, Dawson EA, Tinken TM, Cable NT, Green DJ. Retrograde flow and shear rate acutely impair endothelial function in humans. *Hypertension.* 2009;53:986-992.
 22. Grace FM, Davies B. Raised concentrations of C reactive protein in anabolic steroid using bodybuilders. *Br J Sports Med.* 2004;38:97-98.
 23. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-979.
 24. Futterman LG, Lemberg L. High-sensitivity C-reactive protein is the most effective prognostic measurement of acute coronary events. *Am J Crit Care.* 2002;11:482-486.
 25. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
 26. Sanip Z, Ariffin FD, Al-Tahami BA, Sulaiman WA, Rasool AH. Obesity indices and metabolic markers are related to hs-CRP and adiponectin levels in overweight and obese females. *Obes Res Clin Pract.* 2013;7:e315-e320.
 27. Sagoe D, McVeigh J, Bjornebekk A, Essilfie MS, Andreassen CS, Pallesen S. Polypharmacy among anabolic-androgenic steroid users: a descriptive metasynthesis. *Subst Abuse Treat Prev Policy.* 2015;10:12.

How to cite this article: Souza FR, Sales ARK, Dos Santos MR, et al. Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users. *Scand J Med Sci Sports.* 2019;29:422-429. <https://doi.org/10.1111/sms.13332>

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

Usuários e não usuários de Esteroides Anabolizantes Praticantes de Atividade Física

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .

Impacto da auto-administração de esteróides androgênicos anabolizantes no sistema cardiovascular

2. PESQUISADOR: Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 59.132

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício – InCor.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

01 – Convite para participação voluntária e objetivos do estudo:

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem por objetivo avaliar o quanto ocorre de alterações no coração e nos vasos do sangue. Alguns casos de aparecimento de alterações no ritmo do coração (arritmias) e fechamento dos vasos sanguíneos no coração foram descritos e que poderiam estar relacionados ao uso excessivo de substâncias hormonais sintéticas, semelhantes ao hormônio masculino chamado de testosterona, ou seja, esteroides androgênicos anabólicos.

Os objetivos, deste estudo serão: avaliar se esses hormônios usados em excesso, ou seja, acima do encontrado no sangue, altera o nível de gordura “ruim” (LDL-colesterol). Também iremos avaliar se o seu colesterol “bom” (HDL colesterol) e o seu colesterol “ruim” (LDL colesterol) pode aumentar a formação de placas de gordura nas artérias do coração, causando um envelhecimento e doença nas coronárias de forma precoce, já que não é comum um aumento desse tipo, acúmulo de placa de gordura em excesso nas artérias do coração, na sua idade. Além disso, iremos verificar também, se o aumento da pressão arterial pode levar a um endurecimento, mais cedo, (sinal precoce de envelhecimento) na principal artéria que sai do coração (Artéria Aorta) que distribui o sangue para todos os órgãos do corpo.

02 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, seus propósitos e identificar os que forem experimentais e não rotineiros;

Coleta de urina: será coletada 01 amostra de sua urina que mostrará os níveis elevados e confirmará que o senhor faz uso excessivo de substâncias hormonais sintéticas (esteroides androgênicos anabólicos). A amostra será identificada com um número e será enviado por esse número para o laboratório de análise, esse procedimento garantirá o sigilo dos resultados encontrados.

Coleta de sangue: Será coletada 01 amostra do seu sangue para a avaliar o colesterol (gordura) no sangue.

Eletrocardiografia: A frequência cardíaca (número de vezes que o coração bate por minuto) será avaliada pelo eletrocardiograma por meio de eletrodos colocados no peito;

Pressão arterial: A pressão arterial será medida por um aparelho que não dói, e que ficará em contato com o dedo por 20 minutos.

Velocidade da onda de pulso (VOP): serão colocados dois aparelhos na superfície da pele (transdutores) sensíveis à pressão sobre a pele das partes mais exteriorizadas das artérias do pescoço que levam o sangue para a cabeça (carótida direita) e para as pernas (femoral direita) o senhor ficará na posição deitada. A imagem será adquirida por meio de uma onda de pulso, sem que lhe cause qualquer desconforto.

Doppler de carótida: será adquirida uma imagem da carótida (artéria do pescoço) e mediremos o calibre desse vaso e o grau de endurecimento.

Densitometria Corporal Computadorizada (DEXA): exame pelo qual verificaremos a sua quantidade de músculo e de gordura no corpo. Você ficará deitado e um equipamento fará uma “leitura” por todo seu corpo.

Ergoespirometria: este exame de esforço em esteira, consiste na utilização de eletrodos para verificar os batimentos e o sinal cardíaco. Você respirará somente pela boca através de um bucal do qual mediremos a quantidade de oxigênio por meio da sua respiração.

Ecocardiograma: será realizado por meio de um aparelho que emite som, que é um tubo que capta a imagem do coração chamado (transdutor de ultrassom). Para isso, colocaremos um gel no peito, sem a blusa, para avaliação da imagem do coração;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Exame para Avaliar a Estrutura do Coração (Ressonância Magnética Cardiovascular): O senhor ficará deitado de barriga para cima sobre uma mesa que tem um tubo aberto, por cerca de 60 minutos. Será necessário que o senhor encha o peito de ar, solte todo o ar e, em seguida, prenda a respiração por alguns segundos em alguns momentos durante o exame. Será injetado em sua veia um contraste. Será necessário o senhor não se alimentar por no mínimo 4 horas antes do exame. O exame de Ressonância não usa radiação para fazer as imagens. Após terminar o exame, o senhor será orientado a aguardar alguns minutos e tomar alguns copos de água. Após o exame, o senhor não precisa ficar internado e nem de repouso.

Exame para Avaliar os Vasos do Coração (Angiotomografia Computadorizada): Nesse exame o senhor ficará deitado de barriga para cima sobre uma mesa por cerca de 10 minutos. A mesa se movimentará algumas vezes pra frente e pra trás por dentro de um anel aberto nas extremidades. Para avaliar a quantidade de endurecimento nas artérias do coração, será necessário o senhor encher o peito de ar e prender a respiração por alguns segundos durante o exame. Para avaliar se o senhor tem alguma obstrução nas artérias do coração, será injetado um contraste na sua veia. Será necessário o senhor não se alimente por no mínimo 4 horas antes do exame. O exame de tomografia usa radiação (raio-X) para fazer as imagens. A radiação é utilizada apenas para fazer as imagens, e será utilizada sempre que o senhor estiver prendendo a respiração durante o exame. Após terminar o exame, o senhor será orientado há aguardar alguns minutos e tomar alguns copos de água. O senhor não precisa ficar internado e nem de repouso, após o exame.

Exame para avaliar os vasos sanguíneos: Nesse exame o senhor ficara deitado de barriga para cima por cerca de 20 minutos. Será aplicado gel numa região do pescoço para deslizar um pequeno aparelho de um sistema de ultrassom que permite avaliar os vasos sanguíneos. Posteriormente, será colocado um manguito no braço para avaliarmos o comportamento do vaso sanguíneo do braço.

03 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Coleta de urina: não há riscos ou desconfortos e os resultados obtidos serão sigilosos e identificados com numeração de conhecimento específico do pesquisador, caso seja necessária confirmação.

Coleta de sangue: Quando a agulha for colocada no seu braço você sentirá uma picada e logo o sangue passará para a seringa. Essa coleta de sangue será feita por uma pessoa que tem experiência nesse tipo de exame.

Eletrocardiografia: Não há riscos.

Pressão arterial: não há riscos. Durante um período de 20 minutos, estando o senhor acordado, o aparelho causa um discreto “aperto” no dedo, porém não é suficiente para impedir a passagem do sangue, o senhor poderá sentir um formigamento leve no dedo indicador.

Velocidade da onda de pulso (VOP): Não há riscos ou desconforto.

Doppler de carótida: Não há riscos ou desconforto.

DEXA: não há riscos ou desconforto.

Ergoespirometria: O fato de você respirar só pela boca nesse exame pode deixar a sua boca um pouco seca. Por ser um exame em que o senhor irá até a exaustão física, você estará sujeito aos riscos que ocorrem quando se faz um esforço (sua pressão pode aumentar exageradamente, podem ocorrer alterações no ritmo do coração ou até uma obstrução das artérias do coração que não foi identificado quando o senhor estava em repouso e, que mostrará se não está indo sangue suficiente para o musculo do coração (arritmias ou isquemia do coração), porém, quando o médico cardiologista, que estará realizando seu exame, observar qualquer alteração que envolva um risco maior para o senhor, o exame será interrompido.

Ecocardiografia: Não há riscos.

Exame para Avaliar a Estrutura do Coração (Ressonância Magnética Cardiovascular): O senhor (a) pode apresentar sensação de estar preso (claustrofobia) durante a realização do exame. Se isso ocorrer, o exame será interrompido. Apesar de pouco comum, podem ocorrer

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

reações alérgicas à administração de contraste. O risco de efeitos adversos graves é muito pequeno (menor que 0,01%, ou seja, 1 evento para cada 10.000 exames). Os sintomas mais leves como dor de cabeça, enjôos, alterações de paladar, urticária (reação alérgica de coceira e vermelhidão) e reações locais como irritação, ardor e sensação de frio ocorrem em menos de 4% dos casos. Reações adversas agudas maiores ao contraste, como fechamento da garganta e queda na pressão arterial e problemas severos com a respiração são raras. Se alguma dessas reações ocorrerem, o senhor (a) será imediatamente atendido por profissionais treinados e capacitados nessa área. Se o senhor (a) tiver problemas nos rins (creatinina > 1,5 mg/dL), o senhor (a) não poderá participar desse estudo. Podem ocorrer acidentes como vazamento do contraste embaixo da pele, cujas consequências em geral são leves e serão atendidas por equipe treinada e capacitada. Há um risco de dor no local onde a agulha é colocada (para colocação do contraste) e o local poderá ficar vermelho e inchado. O risco de infecção é mínimo, pois o local do seu braço onde a agulha será colocada será cuidadosamente limpo e desinfetado.

Exame para Avaliar os Vasos do Coração (Angiotomografia Computadorizada): O senhor (a) receberá radiação durante o exame. Essa quantidade de radiação é segura e é menor do que a quantidade máxima que o senhor (a) pode receber em ambiente de trabalho por ano. Reações ao contraste são pouco comuns. Estas reações podem variar de sensação de forte calor no corpo, coceira leve e urticária (reação alérgica de coceira e vermelhidão), a reações sérias incluindo dificuldade de respirar e queda na pressão arterial e problemas severos com a respiração. Podem ocorrer reações tardias em 0.5 a 2.0% dos pacientes, depois de 3 horas a dois dias após o exame, desaparecendo usualmente com uma semana. Reações leves ao contraste ocorrem em 3% dos que utilizam o contraste. Reações graves são mais raras e podem ocorrer em 1 a cada 1000 pacientes. Se o senhor (a) tiver alguma alergia conhecida ao contraste, ou problemas nos rins (creatinina > 1,5 mg/dL), não poderá participar desse estudo. Durante toda a realização do exame, o senhor (a) terá à sua disposição profissionais capacitados e especializados para prestar atendimento. Há também um pequeno risco de dano renal a partir do agente de contraste. Tal dano é muito raro e geralmente reversível. O risco de desenvolver insuficiência renal é raro. Há um risco de dor no local onde a agulha é colocada no braço (para colocação do contraste) e o local poderá ficar vermelho e inchado. O risco de infecção é mínimo, pois o local do seu braço onde a agulha será colocada será cuidadosamente limpo e desinfetado.

Exame para avaliar os vasos sanguíneos: Não há riscos, mas poderá haver formigamento passageiro na mão durante a oclusão com o manguito no braço.

04 – Benefícios para o participante: Não há benefícios imediatos aos sujeitos de pesquisa, porém informaremos sobre o seu estado de saúde e orientaremos quanto as possíveis repercussões da utilização de excesso de hormônios masculino no sangue (esteróides androgênicos anabólicos), baseados em todas as informações clínicas, laboratoriais e analíticas, que os mesmos terão acesso, de acordo com o capítulo III. item 3. p da resolução 196/96 (MS).

05 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; A avaliação laboratorial (dosagem de componentes do sangue e de substâncias) poderá identificar precocemente alterações no controle do metabolismo, provenientes do uso excessivo de hormônios masculino no sangue (esteróides androgênicos anabólicos) e preveni-lo de problemas futuros na sua saúde.

06 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, o senhor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 – Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração, HC-FMUSP – Telefones: 2661-5043/5099 (comercial). Se o senhor tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

07 – Garantia de liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento: É garantida a liberdade de retirada de seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

08 – Garantido o direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a sua identificação

09 – Atualização sobre os resultados parciais das pesquisas: O senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais dessa pesquisa, quando o estudo estiver em aberto, e/ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 – Despesas e compensações: Não há previsão de recompensas pela sua participação no estudo. Entretanto, em caso de algum dano à sua saúde decorrente do estudo, é garantido ao Senhor (a) todo o atendimento médico na Instituição sem nenhum custo.

11 – compromisso do pesquisador de utilizar os dados e material coletado somente para esta pesquisa: O pesquisador desse estudo se compromete em utilizar os dados e o material coletado, incluindo material biológico, somente para fins de pesquisa, podendo haver estudos futuros, que só serão realizados com prévia aprovação da CAPPesp

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Impacto da auto-administração de esteróides androgênicos anabolizantes no sistema cardiovascular**".

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Eu discuti com a Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

Grupo Controle Sedentário

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.

Impacto da auto-administração de esteróides androgênicos anabolizantes no sistema cardiovascular

2. PESQUISADOR: Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº** 59.132

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício – InCor.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

01 – Convite para participação voluntária e objetivos do estudo:

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, a fim de utilizar seus resultados como um padrão de normalidade, com aqueles indivíduos que tenham a mesma faixa de idade que o senhor tem e, que fazem pratica regular de musculação, que utilizam ou não substancias hormonais sintéticas em excesso, semelhantes ao hormônio masculino chamado de testosterona (esteroides androgênicos anabólicos). Os objetivos, deste estudo serão: avaliar se esses hormônios usados em excesso, ou seja, acima do encontrado no sangue, altera o nível de gordura “ruim” (LDL-colesterol). Também iremos avaliar se o seu colesterol “bom” (HDL colesterol) e o seu colesterol “ruim” (LDL colesterol) pode aumentar a formação de placas de gordura nas artérias do coração, causando um envelhecimento e doença nas artérias do coração (coronárias) de forma precoce, já que não é comum um aumento desse tipo, acúmulo de placa de gordura em excesso nas artérias do coração, na sua idade. Além disso, iremos verificar também, se o aumento da pressão do sangue nas artérias, pode levar a um endurecimento, mais cedo (sinal precoce de envelhecimento), na principal artéria que sai do coração (Artéria Aorta) que distribui o sangue para todos os órgãos do corpo.

02 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, seus propósitos e identificar os que forem experimentais e não rotineiros;

Coleta de urina: será coletada 01 amostra de sua urina que mostrará que o senhor não faz uso de substâncias hormonais sintéticas (esteroides androgênicos anabólicos). A amostra será identificada com um número e será enviado por esse número para o laboratório de análise, esse procedimento garantirá o sigilo dos resultados encontrados.

Coleta de sangue: Será coletada 01 amostra do seu sangue para a avaliar o colesterol (gordura) no sangue.

Eletrocardiografia: A frequência cardíaca (número de vezes que o coração bate por minuto) será avaliada pelo eletrocardiograma por meio de eletrodos colocados no peito;

Pressão arterial: A pressão arterial será medida por um aparelho que não dói, e que ficará em contato com o dedo por 20 minutos.

Velocidade da onda de pulso (VOP): serão colocados dois aparelhos na superfície da pele (transdutores) sensíveis à pressão sobre a pele das partes mais exteriorizadas das artérias do pescoço que levam o sangue para a cabeça (carótida direita) e para as pernas (femoral direita) o senhor ficará na posição deitada. A imagem será adquirida por meio de uma onda de pulso, sem que lhe cause qualquer desconforto.

Doppler de carótida: será adquirida uma imagem da carótida (artéria do pescoço) e mediremos o calibre desse vaso e o grau de endurecimento.

Densitometria Corporal Computadorizada (DEXA): exame pelo qual verificaremos a sua quantidade de musculo e de gordura no corpo. Você ficará deitado e um equipamento fará uma “leitura” por todo seu corpo.

Ergoespirometria: este exame de esforço em esteira, consiste na utilização de eletrodos para verificar os batimentos e o sinal cardíaco. Você respirará somente pela boca através de um bucal do qual mediremos a quantidade de oxigênio por meio da sua respiração.

Ecocardiograma: será realizado por meio de um aparelho que emite som, que é um tubo que capta a imagem do coração chamado (transdutor de ultrassom). Para isso, colocaremos um gel no peito, sem a blusa, para avaliação da imagem do coração;

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Exame para Avaliar a Estrutura do Coração (Ressonância Magnética Cardiovascular): O senhor ficará deitado de barriga para cima sobre uma mesa que tem um tubo aberto, por cerca de 60 minutos. Será necessário que o senhor encha o peito de ar, solte todo o ar e, em seguida, prenda a respiração por alguns segundos em alguns momentos durante o exame. Será injetado em sua veia um contraste. Será necessário o senhor não se alimentar por no mínimo 4 horas antes do exame. O exame de Ressonância não usa radiação para fazer as imagens. Após terminar o exame, o senhor será orientado a aguardar alguns minutos e tomar alguns copos de água. Após o exame, o senhor não precisa ficar internado e nem de repouso.

Exame para Avaliar os Vasos do Coração (Angiotomografia Computadorizada): Nesse exame o senhor ficará deitado de barriga para cima sobre uma mesa por cerca de 10 minutos. A mesa se movimentará algumas vezes pra frente e pra trás por dentro de um anel aberto nas extremidades. Para avaliar a quantidade de endurecimento nas artérias do coração, será necessário o senhor encher o peito de ar e prender a respiração por alguns segundos durante o exame. Para avaliar se o senhor tem alguma obstrução nas artérias do coração, será injetado um contraste na sua veia. Será necessário o senhor não se alimente por no mínimo 4 horas antes do exame. O exame de tomografia usa radiação (raio-X) para fazer as imagens. A radiação é utilizada apenas para fazer as imagens, e será utilizada sempre que o senhor estiver prendendo a respiração durante o exame. Após terminar o exame, o senhor será orientado há aguardar alguns minutos e tomar alguns copos de água. O senhor não precisa ficar internado e nem de repouso, após o exame.

03 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Coleta de urina: não há riscos ou desconfortos e os resultados obtidos serão sigilosos e identificados com numeração de conhecimento específico do pesquisador, caso seja necessária confirmação.

Coleta de sangue: Quando a agulha for colocada no seu braço você sentirá uma picada e logo o sangue passará para a seringa. Essa coleta de sangue será feita por uma pessoa que tem experiência nesse tipo de exame e o senhor sentirá um pequeno desconforto de dor da picada de agulha.

Eletrocardiografia: Não há riscos.

Pressão arterial: não há riscos. Durante um período de 20 minutos, estando o senhor acordado, o aparelho causa um discreto “aperto” no dedo, porém não é suficiente para impedir a passagem do sangue, o senhor poderá sentir um formigamento leve no dedo indicador.

Velocidade da onda de pulso (VOP): Não há riscos ou desconforto.

Doppler de carótida: Não há riscos ou desconforto.

DEXA: não há riscos ou desconforto.

Ergoespirometria: O fato de você respirar só pela boca nesse exame pode deixar a sua boca um pouco seca. Por ser um exame em que o senhor irá até a exaustão física, você estará sujeito aos riscos que ocorrem quando se faz um esforço (sua pressão pode aumentar exageradamente, podem ocorrer alterações no ritmo do coração ou até uma obstrução das artérias do coração que não foi identificado quando o senhor estava em repouso e, que mostrará se não está indo sangue suficiente para o musculo do coração (arritmias ou isquemia do coração), porém, quando o médico cardiologista, que estará realizando seu exame, observar qualquer alteração que envolva um risco maior para o senhor, o exame será interrompido.

Ecocardiografia: Não há riscos.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Exame para Avaliar a Estrutura do Coração (Ressonância Magnética Cardiovascular): O senhor pode apresentar sensação de estar preso (claustrofobia) durante a realização do exame. Se isso ocorrer, o exame será interrompido. Apesar de pouco comum, podem ocorrer reações alérgicas à administração de contraste. O risco de efeitos adversos graves é muito pequeno (menor que 0,01%, ou seja, 1 evento para cada 10.000 exames). Os sintomas mais leves como dor de cabeça, enjôos, alterações de paladar, urticária (reação alérgica de coceira e vermelhidão) e reações locais como irritação, ardor e sensação de frio ocorrem em menos de 4% dos casos. Reações adversas agudas maiores ao contraste, como fechamento da garganta e queda na pressão do sangue e problemas severos com a respiração são raras. Se alguma dessas reações ocorrerem, o senhor será imediatamente atendido por profissionais treinados e capacitados nessa área. Se o senhor tiver problemas nos rins (creatinina > 1,5 mg/dL), o senhor não poderá participar desse estudo. Podem ocorrer acidentes como vazamento do contraste embaixo da pele, cujas consequências em geral são leves e serão atendidas por equipe treinada e capacitada. Há um risco de dor no local onde a agulha é colocada (para colocação do contraste) e o local poderá ficar vermelho e inchado. O risco de infecção é mínimo, pois o local do seu braço onde a agulha será colocada será cuidadosamente limpo e desinfetado.

Exame para Avaliar os Vasos do Coração (Angiotomografia Computadorizada): O senhor receberá radiação durante o exame. Essa quantidade de radiação é segura e é menor do que a quantidade máxima que o senhor pode receber em ambiente de trabalho por ano. Reações ao contraste são pouco comuns. Estas reações podem variar de sensação de forte calor no corpo, coceira leve e urticária (reação alérgica de coceira e vermelhidão), a reações sérias incluindo dificuldade de respirar e queda na pressão arterial e problemas severos com a respiração. Podem ocorrer reações tardias em 0.5 a 2.0% dos pacientes, depois de 3 horas a dois dias após o exame, desaparecendo usualmente com uma semana. Reações leves ao contraste ocorrem em 3% dos que utilizam o contraste. Reações graves são mais raras e podem ocorrer em 1 a cada 1000 pacientes. Se o senhor tiver alguma alergia conhecida ao contraste, ou problemas nos rins (creatinina > 1,5 mg/dL), não poderá participar desse estudo. Durante toda a realização do exame, o senhor terá à sua disposição profissionais capacitados e especializados para prestar atendimento. Há também um pequeno risco de dano renal a partir do agente de contraste. Tal dano é muito raro e geralmente reversível. O risco de desenvolver insuficiência renal é raro. Há um risco de dor no local onde a agulha é colocada no braço (para colocação do contraste) e o local poderá ficar vermelho e inchado. O risco de infecção é mínimo, pois o local do seu braço onde a agulha será colocada será cuidadosamente limpo e desinfetado.

04 – Benefícios para o participante: Não há benefícios para o senhor. Porém informaremos sobre o seu estado de saúde e orientaremos o senhor de acordo com o resultado dos exames que serão analisados, e poderemos também orienta-lo sobre a realização de exercício físico regular, dieta e cuidados para a prevenção de riscos para a sua saúde, baseados em todas as informações clínicas, laboratoriais e analíticas, que os mesmos terão acesso, de acordo com o capítulo III. item 3. p da resolução 196/96 (MS).

05 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; A avaliação laboratorial (dosagem de componentes do sangue) poderá identificar alterações no controle do metabolismo e preveni-lo de problemas futuros na sua saúde.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

06 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, o senhor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 – Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração, HC-FMUSP – Telefones: 2661-5043/5099 (comercial). Se o senhor tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

07 – Garantia de liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento: É garantida a liberdade de retirada de seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

08 – Garantido o direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a sua identificação

09 – Atualização sobre os resultados parciais das pesquisas: O senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais dessa pesquisa, quando o estudo estiver em aberto, e/ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 – Despesas e compensações: Não há previsão de recompensas pela sua participação no estudo. Entretanto, em caso de algum dano à sua saúde decorrente do estudo, é garantido ao Senhor (a) todo o atendimento médico na Instituição sem nenhum custo.

11 – Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e material coletado somente para esta pesquisa: O pesquisador desse estudo se compromete em utilizar os dados e o material coletado, incluindo material biológico, somente para fins de pesquisa, podendo haver estudos futuros, que só serão realizados com prévia aprovação da CAPPesq.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Impacto da auto-administração de esteróides androgênicos anabolizantes no sistema cardiovascular**”.

Eu discuti com a Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____