GUSTAVO GRAEFF KURA

**Repercussões morfológicas do treinamento resistido e do Decanoato de
Nandrolona no músculo cardíaco de ratos wistar jovens**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2019

GUSTAVO GRAEFF KURA

**Repercussões morfológicas do treinamento resistido e do Decanoato de
Nandrolona no músculo cardíaco de ratos wistar jovens**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

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

Kura, Gustavo Graeff

Repercussões morfológicas do treinamento
resistido e do Decanoato de Nandrolona no músculo
cardíaco de ratos wistar jovens / Gustavo Graeff
Kura. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Descritores: 1.Miocárdio 2.Hipertrofia cardíaca
3.Cardiomegalia 4.Anabolizantes 5.Treinamento
resistido 6.Decanoatos

USP/FM/DBD-167/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/07/2014, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 098/14 intitulado: "REVERSIBILIDADE DOS EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO E DO DECANOATO DE NANDROLONA NA MORFOLOGIA DO MÚSCULO CARDÍACO" que utilizará 64 animais da espécie rato, apresentado pelo Departamento de Fisiopatologia Experimental - FMUSP

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edson Aparecido Liberti

Pesquisador (a) Executante: Gustavo Graeff Kura

CEUA-FMUSP, 17 de Julho de 2014

Dr. Eduardo Pompen
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER Nº 031/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 13/12/13, analisou o projeto de pesquisa "**Reversibilidade dos efeitos do treinamento resistido e do decanoato de nandrolona na morfologia do músculo cardíaco**", registro na CEUA Nº 016/2013, de responsabilidade do pesquisador **Gustavo Graeff Kura**.

Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o projeto relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 17 de dezembro de 2013.

Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Coordenadora – CEUA – UPF

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a meus pais, meu amado filho e a minha esposa.

Por todo o incentivo, dedicação, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de algumas pessoas, portanto meus sinceros agradecimentos a:

Minha família

Me. Alessandra Paula Merlin

Dr. Edson Aparecido Liberti

Gabriela Martins

Renan Bernardelli

Tainá Miotto

Rodrigo Vieira dos Santos

Sirlei Cazarotto

Sebastião Aparecido Boleta

Sonia Regina Yokomizo

Marta Maria da Silva Riguetti

Todos os integrantes do Biotério da Universidade de Passo Fundo

Todos que de alguma maneira me ajudaram e que tiveram seus nomes omitidos, meu sincero, MUITO OBRIGADO!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVO	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Treinamento resistido e sistema cardiovascular.	24
3.2 Esteroides anabolizantes e sistema cardiovascular	28
3.3 Hipertrofia cardíaca	31
3.4 Matriz extracelular do miocárdio (colágeno).....	35
3.5 Ultraestrutura do tecido muscular	37
3.6 Alterações ultraestruturais do miocárdio em decorrência dos esteroides anabolizantes andrógenos	39
4. MÉTODOS	46
4.1 Amostra.....	46
4.2 Delineamento experimental	46
4.3 Tratamento farmacológico	46
4.4 Protocolo de Treinamento	47
4.5 Análise morfofuncional por ecocardiografia com Doppler	48
4.6 Eutanásia	50
4.7 Índice de hipertrofia cardíaca.....	50
4.8 Microscopia de luz	50
4.9 Avaliação estereológica do coração.....	50
4.9.1 Volume do ventrículo esquerdo.....	50
4.9.2 Densidade de volume das fibras musculares cardíaca (FMC) e do interstício cardíaco (IC).	52
4.10 Avaliação morfológica do coração.....	52
4.10.1 Espessura dos cardiomiócitos.....	52
4.10.2 Evidenciação e tipificação das fibras de colágeno através do método de Picrosirius	52
4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	53
4.11 Análise Estatística	53
5. RESULTADOS	55
5.1 Pesos (corporal e ventrículo esquerdo) índice de hipertrofia cardíaca	55
5.2 Análises estereológicas e morfométricas	56
5.3 Avaliação morfofuncional do ventrículo esquerdo determinado por ecocardiografia.	59
5.4 Aspectos qualitativos	62
5.4.1 Análise do colágeno.....	62
5.4.2 Ultraestrutura dos cardiomiócitos.....	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipertrofia excêntrica (sobrecarga de volume) e concêntrica (sobrecarga de pressão).	32
Figura 2 - Remodelamento cardíaco fisiológico e patológico.	34
Figura 3 - Representação esquemática da rede de colágeno do miocárdio.	36
Figura 4 - Fibra muscular e miofibrila.....	38
Figura 5 - Figura esquemática de um segmento miofibrilar.....	39
Figura 6 - Micrografia eletrônica de transmissão do músculo esquelético, evidenciando as estruturas do sarcômero.....	39
Figura 7 – Aparato de treinamento	47
Figura 8 – Ecocardiografia transtorácica (MyLab 70 Esaote ®).....	49
Figura 9 - (A) Avaliação morfológica através do modo M. (B) - avaliação da função diastólica através do Doppler.....	49
Figura 10 - Ilustração do fluxo de trabalho para determinar os volumes da parede do ventrículo esquerdo, do lúmen e volume total do ventrículo esquerdo. As sete fatias foram colocadas com o mesmo lado para cima (A), uma grade de pontos é colocado sobre as amostras e os pontos que atingem a superfície de corte de cada fatia são contados e somados (B).	51
Figura 11 – Imagem ilustrativa demonstrando o sistema teste.....	52
Figura 12 - Determinação da dimensão transversal (espessura) de cardiomiócitos	52
Figura 13 - Corte transversal da parte média do ventrículo esquerdo, onde se evidenciam os campos: anterior (A), lateral (L) e posterior (P) determinados para a avaliação qualitativa das fibras colágenas.	53
Figura 14 - Peso corporal, gráfico (A) subgrupos ^A . Gráfico (B) subgrupos ^B , *diferença significativa em relação ao CO ^B P<0,05.....	55
Figura 15 - Peso do ventrículo esquerdo, gráfico (A) subgrupos ^A . Gráfico (B) subgrupos ^B	56
Figura 16 - Relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, gráfico (A) subgrupos ^A ; *diferença significativa em relação ao CO ^A e TR ^A P<0,01. Gráfico (B) subgrupos ^B ; *diferença significativa em relação ao CO ^B P<0,05 e TR ^B P<0,01.....	56
Figura 17 - Espessura dos cardiomiócitos, gráfico (A) subgrupos ^A ; *diferença significativa em relação ao CO ^A , TR ^A P<0,05; # diferença significativa em relação ao DN ^A P<0,05. Gráfico (B) subgrupos ^B ; *diferença significativa em relação ao CO ^B P<0,05; # diferença significativa em relação ao DN ^B P<0,05; † diferença significativa em relação ao TR ^B	57
Figura 18 - Vv (cardiomiócitos), gráfico (A) subgrupos ^A . *diferença significativa em relação ao TR ^A P<0,01. Gráfico (B) subgrupos ^B	58
Figura 19 - Vv (interstício) gráfico (A) subgrupos ^A ; *diferença significativa em relação ao TR ^A P<0,01; # diferença significativa em relação ao TR ^A P<0,05. Gráfico (B) subgrupos ^B	58
Figura 20 - Fotomicrografia de parte da parede do ventrículo esquerdo de animais dos subgrupos ^B evidenciando as fibras colágenas (A- grupo CO ^B ; B- grupo TR ^B ; C- grupo DN ^B ; D- grupo TRDN ^B). (Picro-sirius sob luz polarizada. Barra de Calibração: 100µm)	63
Figura 21 – Microscopia eletrônica de transmissão (2500X) do miocárdio dos ratos dos subgrupos ^A . Imagem A grupo CO ^A , sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem B e C grupo	

DN^A, sarcômero (seta dupla) aparentemente apresenta um comprimento reduzido com dissolução dos miofilamentos, os miofilamentos estão destruídos (seta em curva), linha Z espessa (seta), na imagem B as mitocôndria (M) estão redondas e inchadas e há uma aparente dilatação do sarcoplasma, banda H e linha M são pouco visíveis (cabeça de seta) o retículo endoplasmático está dilatado (cruz). Imagem D grupo TR^A, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem E e F grupo TRDN^A, sarcômero (seta dupla), linha Z espessa (seta), linha Z em forma de curva (asterisco), aparente ruptura da linha Z (círculo) mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta) 64

Figura 22 – Microscopia eletrônica de transmissão (25000x), do miocárdio dos ratos dos subgrupos^B. Imagem A grupo CO^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem B, C e D grupo DN^B, os sarcômero aparentemente apresentam dissolução das miofibrilas, linha Z afilada (seta), banda H e linha M (cabeça de seta), mitocôndria (M); na imagem B um sarcômero é curto de forma anormal (seta dupla), linha Z em forma de curva (asterisco); na imagem C os filamentos estão destruídos (seta em curva); na imagem D aparente destruição da linha Z (círculo). Imagem E grupo TR^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M). Imagem F, G e H grupo TRDN^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), banda H e linha M (cabeça de seta); na imagem F os sarcômeros apresentam dissolução das miofibrilas, filamentos estão destruídos (seta em curva), aparente destruição da linha Z (círculo); na imagem G um sarcômero é curto de forma anormal (seta dupla), linha Z em forma de curva (asterisco); nas imagens G e H as mitocôndria estão hipertrofiadas (M). 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Periodização e protocolo de treinamento resistido	48
Tabela 2 – Volumes do ventrículo esquerdo - subgrupos ^A	59
Tabela 3 – Volumes do ventrículo esquerdo - subgrupos ^B	59
Tabela 4 - Parâmetros morfológicos determinados por ecocardiografia subgrupos ^A	60
Tabela 5 - Parâmetros morfológicos determinados por ecocardiografia subgrupos ^B	60
Tabela 6 – Parâmetros fisiológicos determinados por ecocardiografia - subgrupos ^A	61
Tabela 7 – Parâmetros fisiológicos determinados por ecocardiografia - subgrupos ^B	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr.	Doutor
Prof.	Professor
ED	Decanoato de Nandrolona
EC	Exercício físico controle
SD	Sedentário e Decanoato de Nandrolona
SC	Sedentário controle
CO	Controle
DN	Decanoato de nandrolona
TR	Treinamento resistido
TRDN	Treinamento resistido e Decanoato de Nandrolona
et al.	E outros
ATP	Adenosina trifosfato
TR	Treinamento resistido
EAA	Esteróide anabolizante andrógeno
DVED	Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole
DVES	Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole
EPPS	Espessura da parede posterior na sístole
EPPD	Espessura da parede posterior na diástole
ESD	Espessura do septo interventricular na diástole
ESS	Espessura do septo interventricular na sístole
FEJ	Fração de ejeção
FEN	Fração de encurtamento
Pico A	Pico de velocidade da onda A
Pico E	Pico de velocidade da onda E
HE	Hematoxilina-eosina
V(P)	Volume da parede do ventrículo esquerdo
Σpp :	Somatório de pontos que tocam a parede do ventrículo esquerdo
a(p)	Área por ponto
T	Espessura do corte
VL	Volume do lúmen.
$\Sigma p1$	Somatório de pontos que tocaram o lúmen.

VT	Ventrículo total do esquerdo
FMC	Fibra musculare cardíaca
IC	Interstício cardíaco
Vv	Densidade de volume
Σp (FMC)	Somatório de pontos que tocam a fibra muscular cardíaca.
Σp (IC)	Somatório de pontos que tocam o interstício cardíaco
Σp (P)	Somatório de pontos que tocam todos os estratos
pH	Potencial de hidrogênio
ed.	Edição
p.	Página
rev.	Revista
v.	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

Mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mmHg	Milímetros de mercúrio
VO _{2máx}	Volume máximo de oxigênio
mg/Kg/semana	Miligrama por quilograma por semana
μm	Micrômetro
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
Nm	Nanômetro
≤	Menor ou igual
<	Menor

RESUMO

Kura GG. *Repercussões morfológicas do treinamento resistido e do Decanoato de Nandrolona no músculo cardíaco de ratos wistar jovens* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são utilizados, sem prescrição terapêutica, por indivíduos que visam aumentar a força muscular ou melhorar a aparência física. No entanto, seus usuários não levam em consideração os efeitos colaterais provocados pela utilização de EAA em muitos órgãos. Dentre os principais efeitos colaterais, destaca-se a hipertrofia cardíaca, que parece ser mais pronunciada quando acompanhada por treinamento físico. A descontinuidade do tratamento com EAA, pode reverter os efeitos colaterais, porém a reversibilidade das alterações patológicas ainda é questionável. No presente estudo verificou-se, sob o aspecto morfofuncional, a influência do Decanoato de Nandrolona (DN) e do treinamento resistido (TR) no músculo cardíaco de ratos, e se as possíveis alterações desencadeadas podem ser revertidas após a interrupção do tratamento. Para tanto, ratos *Wistar* foram separados aleatoriamente em quatro grupos com dez animais: Controle (CO); Decanoato de Nandrolona (DN); Treinamento resistido (TR); Treinamento resistido e Decanoato de Nandrolona (TRDN). Passadas 16 semanas de tratamento, 5 animais de cada grupo foram avaliados e eutanasiados, constituindo-se assim, os subgrupos^A. A partir desse momento, até a 28ª semana, cessaram os procedimentos nos animais restantes de cada grupo (subgrupos^B) que também foram avaliados e eutanasiados. O tratamento farmacológico consistiu da aplicação, duas vezes por semana, de DN (5mg/kg cada aplicação) nos grupos DN e TRDN, e de óleo de amendoim (0,2 ml/kg cada aplicação) nos grupos CO e TR. O treinamento físico foi realizado cinco dias por semana, onde os animais escalaram uma escada, para imprimir uma sobrecarga foi adicionado um peso na cauda do animal, o TR foi periodizado em microciclos, com aumentos de forma linear nas sobrecargas de volume e intensidade. Os resultados encontrados nos subgrupos^A, indicam a presença de hipertrofia cardíaca patológica nos grupos tratados com DN, o miocárdio destes animais apresentou consideráveis alterações ultraestruturais, como mitocôndrias de formato irregular e menor densidade das cristas, os sarcômeros apresentam miofibrilas em menor densidade e ausência em alguns trechos, as linhas Z apresentam um espessamento e algumas estão curvadas. Após doze semanas de descontinuidade do tratamento, os resultados dos subgrupos^B indicam a

presença de hipertrofia cardíaca nos grupos que utilizaram DN e TR, a hipertrofia cardíaca patológica verificada nos grupos que utilizaram DN foi seguida de alterações ultraestruturais semelhantes as verificadas nos grupos que utilizaram DN no subgrupo^A, com exceção das linhas Z afiladas e destruídas em alguns sarcômeros e aparente normalidade no aspecto das mitocôndrias. Por outro lado a hipertrofia cardíaca encontrada no grupo que utilizou somente TR não foi acompanhada de alterações ultraestruturais. Em ambos os momentos (subgrupos) do estudo, a hipertrofia cardíaca desencadeada pelo DN foi potencializada com o incremento do TR, em ambos os momentos do estudo também foi observado um remodelamento na matriz extracelular do miocárdio, que alterou o padrão e a distribuição das fibras de colágeno do miocárdio. Em conclusão, estes resultados confirmaram que o uso de EAA provoca hipertrofia cardíaca patológica, seguida de alterações deletérias nas ultraestruturas do miocárdio, que não são totalmente reversíveis após a descontinuidade do tratamento.

Descritores: Miocárdio; Hipertrofia cardíaca; Cardiomegalia; Anabolizantes; Treinamento resistido; Decanoatos.

ABSTRACT

Kura GG. *Morphological repercussions of resistance training and Nandrolone decanoate on the cardiac muscle of young wistar rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Anabolic androgenic steroids (AAS) are used without prescription by individuals seeking to increase muscle strength or improve physical appearance. However, its users do not take into account the side effects caused by the use of AAS in many organs. Among the main side effects, there is cardiac hypertrophy, which seems to be more pronounced when accompanied by physical training. Discontinuation of AAS treatment may reverse side effects, but the reversibility of pathological changes is still questionable. In the present study, the influence of Nandrolone Decanoate (DN) and resistance training (TR) on the cardiac muscle of rats was observed in the morphofunctional aspect, and whether the possible alterations triggered can be reversed after discontinuation of treatment. For this, Wistar rats were randomly divided into four groups with ten animals: Control (CO); Nandrolone Decanoate (DN); Resistance training (TR); Resistance training and Nandrolone Decanoate (TRDN). After 16 weeks of treatment, 5 animals from each group were evaluated and euthanized, constituting the subgroups A. From that moment until the 28th week, the procedures in the remaining animals of each group (subgroups B) that were also evaluated and euthanized ceased. Pharmacological treatment consisted of the application of DN (5mg/kg each application) in the DN and TRDN groups, and of peanut oil (0.2ml/kg each application) in the CO and TR groups twice a week. The physical training was performed five days a week, where the animals climbed a ladder, to print an overload was added a weight in the tail of the animal, the TR was periodizado in microcycles, with increases of linear form in the overloads of volume and intensity. The results found in the subgroups A, indicate the presence of pathological cardiac hypertrophy in the groups treated with DN, the myocardium of these animals presented considerable ultrastructural alterations, such as mitochondria of irregular shape and lower density of ridges, the sarcomeres present myofibrils in lower density and absence in some stretches, the Z lines have a thickening and some are curved. After twelve weeks of treatment discontinuation, the subgroup B results indicate the presence of cardiac hypertrophy in the groups using DN and TR, the pathological cardiac hypertrophy observed in the groups that used DN was followed by similar ultrastructural changes in those groups that used DN in the subgroup A, with the

exception of sharp and destroyed Z lines in some sarcomeres and apparent normality in the aspect of mitochondria. On the other hand, the cardiac hypertrophy found in the group that used only TR was not accompanied by ultrastructural alterations. In both moments (subgroups) of the study, the cardiac hypertrophy triggered by the DN was potentiated with the increase of the TR, in both moments of the study also a remodeling was observed in the extracellular matrix of the myocardium, that changed the pattern and the distribution of the fibers of myocardial collagen. In conclusion, these results confirmed that the use of AAS causes pathological cardiac hypertrophy, followed by deleterious changes in myocardial ultrastructures, which are not fully reversible after discontinuation of treatment.

Descriptors: Myocardium; cardiac hypertrophy; Cardiomegaly; Steroids; Resistance training, Decanoates.

1. INTRODUÇÃO

A hipertrofia ventricular esquerda é uma doença grave, fortemente associada ao desenvolvimento de doença arterial coronariana, doença cerebrovascular, insuficiência cardíaca e morte súbita^{1,2}.

Hipertrofia cardíaca refere-se ao aumento da massa do coração, em decorrência de respostas adaptativas do miocárdio, que pode ser influenciado por uma sobrecarga fisiológica ou patológica. Entende-se por hipertrofia fisiológica o processo adaptativo que ocorre em resposta ao treinamento físico e nesse caso não parece estar associado a induzir prejuízos na função cardíaca.

É de conhecimento científico que o TR, conhecido popularmente como musculação, pode provocar uma hipertrofia cardíaca fisiológica desencadeada pelas sobrecargas de pressão que ocorrem durante a realização destes exercícios^{3,4}.

Os estudos que investigaram os efeitos dos esteroides anabolizantes na morfologia cardíaca de humanos e animais tem verificado hipertrofia cardíaca⁵⁻⁸, mas são poucos os estudos disponíveis na literatura que abordam TR e esteróides anabolizantes. Em humanos os estudos disponíveis na literatura não conseguem controlar fatores com tempo de uso, doses, substância e protocolos de treinamento utilizados. A carência de trabalhos publicados na literatura pode estar relacionada também a fatores éticos e metodológicos.

Com relação à hipertrofia cardíaca provocada através dos esteroides anabolizantes, o uso desse tipo de substância em humanos pode gerar resultados duvidosos, pois na população de usuários que faz a utilização indiscriminada dessas substâncias (atletas e fisiculturistas) não há como controlar variáveis como estilo de vida, intensidade e volume de treinamento.

Atualmente sabe-se que diferentes formas de exercícios levam a diferentes formas de hipertrofia, a interpretação e a confiabilidade dos resultados gerados pelas pesquisas podem ser controversas e de difícil análise, pois a maioria dos usuários destas drogas faz o seu próprio ciclo anabólico utilizando uma vasta quantidade de drogas com coquetéis e doses diferentes⁹. Os trabalhos com humanos disponíveis na literatura, referentes a esta temática, utilizaram como amostras sujeitos que já usavam este tipo de droga por algum tempo e faziam uso de uma vasta gama de substâncias anabólicas^{10,11}.

O uso de modelo animal para investigar os efeitos do TR e dos esteroides anabolizantes sobre a morfologia do músculo estriado cardíaco pode resolver algumas lacunas que são quase impossíveis de solucionar em estudos envolvendo seres humanos. Neste contexto, com a utilização de um programa de TR em ratos é possível controlar muitos fatores metodológicos, farmacológicos e ambientais como: as drogas utilizadas, tempo de ciclo anabólico, assim como a modalidade de exercício realizado.

A utilização de um modelo animal permite que após o experimento, os animais sejam sacrificados e o coração seja removido para ser submetido a uma variedade de análises fisiológica, bioquímicas, morfológicas e moleculares, numa tentativa de compreender os mecanismos envolvidos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar sob o aspecto morfofuncional no músculo cardíaco de ratos, a influência do DN e do TR, e analisar se após a descontinuidade do tratamento as alterações desencadeadas podem ser revertidas.

2.2 Objetivos Específicos

Com o uso de metodologias histológicas, ultraestruturais, ecocardiográficas e estereológicas, avaliar:

Os volumes do ventrículo esquerdo, dos cardiomiócitos e do tecido conjuntivo;

Os diâmetros e espessuras do ventrículo esquerdo;

A ultraestrutura dos cardiomiócitos;

A espessura dos cardiomiócitos;

As funções cardíacas sistólica e diastólica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Treinamento resistido e sistema cardiovascular.

O TR também conhecido como treinamento de força, treinamento contra resistência e musculação, envolve ativação voluntária de músculos esqueléticos contra alguma forma de resistência externa, que pode ser proporcionada pelo peso corporal, pesos livres, molas, elásticos e máquinas específicas¹².

Os principais efeitos benéficos do TR ocorrem no sistema músculo esquelético, contribuindo para desenvolver e manter a força muscular, a resistência muscular e a massa muscular¹³, prevenindo a sarcopenia e a osteoporose¹⁴⁻¹⁷. Embora o TR seja reconhecido como sendo um modelo de treinamento eficaz para o desenvolvimento da força, potência e massa muscular, os seus benefícios sobre a saúde só foram reconhecido recentemente¹⁸. Antes de 1990 o TR não fazia parte das diretrizes de recomendação para a prática de exercícios físicos e reabilitação da *American Heart Association* e do *American College of Sports Medicine*¹⁸. Em 1990, a *American College of Sports Medicine* reconheceu formalmente a importância de um programa completo de atividade física e acrescentou o TR em seu posicionamento oficial¹⁹. Em 1991, a *American Heart Association* e a *American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation* também incorporaram o TR dentro de seus regimes de reabilitação física, e atualmente a maioria das organizações de saúde recomendam o TR como parte de um programa completo de exercícios²⁰.

O conhecimento acerca dos efeitos benéficos do TR no sistema cardiovascular ocorre em menor proporção, quando comparado com o existente na literatura, em relação ao treinamento aeróbio de corrida ou natação.

Levando em consideração o princípio da especificidade do treinamento, parece claro que o treinamento aeróbio leva a um aumento consistente nos marcadores fisiológicos de aptidão cardiorrespiratória²¹. Esta constatação parece ter influenciado no número de estudos disponíveis na literatura acerca dos efeitos dos exercícios resistidos no sistema cardiorrespiratório. Por não ser a modalidade de exercícios físicos mais apropriada para melhorar a potência aeróbia e a omissão de diretrizes para o TR, foram interpretadas como significando que este tipo de exercício não era importante para o sistema cardiorrespiratório.

Neste contexto, a dificuldade em realizar TR com animais de laboratório também contribuiu para o número pequeno de pesquisas que investigam as adaptações induzidas pelo TR na morfologia cardíaca. Modelos de treinamento aeróbio aplicados em animais de laboratório utilizam movimentos naturais a qualquer animal, como caminhar e nadar, ao contrário do TR que necessita da utilização de uma resistência externa ao movimento.

As adaptações agudas e crônicas provocadas pelos exercícios resistidos no sistema cardiovascular começaram a ser desvendadas em meados da década de 80.

Alguns estudos clássicos que investigaram o efeito do TR sobre o parâmetro de aptidão cardiorrespiratória $VO_{2máx}$, não observaram aumentos significativos nesta variável^{22,23}, ou demonstraram somente uma melhora modesta em torno de 4 a 15% no $VO_{2 máx}$.²⁴⁻²⁶

Nesse sentido, os pequenos aumentos encontrados no $VO_{2máx}$, após um programa de TR, na opinião de Verrill e Ribisl²⁷ podem ser atribuídos a muitos fatores dentre eles menor consumo de oxigênio durante os exercícios resistidos, diferenças nos protocolo de treinamento, duração no tempo de intervalo entre as séries, características da população examinada, volume total de trabalho, mudanças no volume e densidade das mitocôndrias e maior capacidade de adaptação em indivíduos com menor condição física.

A primeira observação da pressão arterial e frequência cardíaca durante a realização de TR foi feita por MacDougall et al.²⁸, neste estudo a pressão arterial foi avaliada através da medida direta, durante a realização de TR com a carga correspondente a 80-100% de uma repetição máxima, que foram levados até a falência muscular. MacDougall et al.²⁸ constataram que, durante uma série de TR, ocorreram picos pressóricos durante a contração concêntrica que provocaram uma elevação extrema das pressões arteriais sistólica e diastólica, que chegaram a atingir 480/350 mmHg em um dos indivíduos avaliados. Porém, imediatamente após a última repetição, a pressão arterial sistólica e a diastólica declinam rapidamente, abaixo dos valores pré-exercício, retornando ao normal após o término do exercício. A explicação para os níveis extremamente altos encontrados na pressão arterial incluem a compressão mecânica da musculatura esquelética sobre os vasos sanguíneos, a elevada pressão intra-abdominal e intratorácica devido à realização da manobra de Valsalva²⁸⁻³¹. Estudos posteriores também observaram um aumento da pressão arterial durante a realização de

TR³²⁻³⁴, porém as cifras não foram tão exorbitantes como as encontradas no estudo de MacDougall et al.²⁸.

Em um modelo de TR para ratos a pressão arterial foi verificada durante a realização de uma série de exercícios de 12 repetições, neste estudo a pressão arterial dos ratos demonstrou um pico pressórico durante cada uma das 12 repetições realizadas, que aumentou em média 48 mmHg³⁵. Esses aumentos foram bem menores que os encontrados por MacDougall et al.²⁸.

Os estudos longitudinais que analisaram os efeitos dos exercícios resistidos sobre a pressão arterial são escassos e apresentam resultados conflitantes. Halbert et al.³⁶, em sua metanálise que avaliou apenas ensaios clínicos randomizados, constaram que as evidências encontradas sobre o efeito do TR na diminuição dos valores pressóricos não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Em contrapartida Kelley e Kelley³⁷, utilizando-se também de uma metanálise de ensaios clínicos randomizados envolvendo indivíduos normotensos e hipertensos, observaram que o TR reduziu, em média, 3% a pressão arterial sistólica e 4% a pressão arterial diastólica em ambos os grupos.

Pinter et al.³⁸ demonstraram que após oito semanas de TR em ratos, a pressão arterial sistólica e diastólica, bem como a frequência cardíaca, diminuíram no grupo de ratos que treinaram a 75% de uma repetição máxima. Em contrapartida os ratos que treinaram com a carga de 60% de uma repetição máxima não obtiveram quedas nas variáveis hemodinâmicas avaliadas. Utilizando o mesmo aparelho de exercícios resistidos para ratos, Barauna et al.³⁹ observaram redução na pressão arterial diastólica e uma manutenção na pressão arterial sistólica após quatro semanas de treinamento na intensidade de 65-75% de uma repetição máxima.

Alguns programas de treinamento físico regular, podem provocar o surgimento de hipertrofia cardíaca. Porém a hipertrofia cardíaca provocada pelos exercícios físicos não está relacionada a situações patológicas que levam a disfunção do órgão. Um exemplo de hipertrofia cardíaca que preserva a função ventricular é o aumento do coração em decorrência dos exercícios físicos. Os resultados de investigações em humanos têm demonstrado mudanças na morfologia do ventrículo esquerdo em decorrência do TR e treinamento aeróbio. As investigações utilizando modelo animal também demonstram respostas morfológicas similares após o treinamento aeróbio de natação e corrida na esteira. O acúmulo de evidências demonstra em humanos e animais, um forte argumento em favor de uma hipertrofia cardíaca fisiológica em decorrência do treinamento

crônico⁴⁰. O treinamento de alto rendimento é frequentemente associado com alterações morfológicas no coração, incluindo aumentos no ventrículo esquerdo, tamanho das câmaras cardíacas, espessura de parede e massa⁴¹. Assim o termo "Coração de atleta", tem sido amplamente utilizado para caracterizar as mudanças que ocorrem no coração, devido aos programas de exercício físico a longo prazo em atletas⁴².

A hipertrofia cardíaca decorrente dos exercícios físicos, pode ser dividida em duas classes. De acordo com o exercício físico realizado, prevalece sobre o coração uma sobrecarga de trabalho volumétrica ou pressórica⁴³. Nos exercícios aeróbios, as principais características hemodinâmicas são o aumento da frequência cardíaca e do volume sistólico levando a uma elevação no débito cardíaco, que consequentemente aumenta o retorno venoso, ocasionando uma sobrecarga volumétrica sobre o coração⁴⁴. Nesta situação a hipertrofia cardíaca é caracterizada predominantemente pela adição de sarcômeros em série, levando a um aumento no comprimento dos cardiomiócitos que consequentemente, aumenta a massa cardíaca e o volume da câmara cardíaca^{42,45}.

Por outro lado, nos exercícios resistidos a principal característica hemodinâmica são os picos de pressão arterial que ocorrem durante a contração concêntrica^{28,46}, acarretando em uma sobrecarga de pressão sobre o coração⁴⁴, que resulta na adição em paralelo dos sarcômeros e consequentemente o aumento da concentração e largura dos cardiomiócitos, que provoca um aumento na espessura da parede ventricular esquerda, sem reduzir o tamanho das câmaras cardíacas^{42,45}.

Nesta linha de raciocínio, algumas patologias como a hipertensão arterial e estenose aórtica provocam uma sobrecarga de pressão que se assemelha às encontradas em praticantes de exercícios resistidos. Uma das diferenças entre as hipertrofias cardíacas está relacionada à sobrecarga de pressão que o coração recebe para provocar efeitos hipertróficos. Durante uma situação patológica o sobrecarga de pressão sobre o coração ocorre durante as 24 horas do dia, em contrapartida a sobrecarga de pressão imposta pelo TR ocorre somente durante a prática dos exercícios que normalmente fica em torno de 30 a 60 minutos por dia. Além do mais, a hipertrofia ocasionada pelo TR parece não estar envolvida com perdas da função do órgão^{4,45}, ao contrário da hipertrofia patológica, que é acompanhada por uma perda de função sistólica e diastólica e um aumento desproporcional da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo e septo interventricular^{47,48}.

3.2 Esteroides anabolizantes e sistema cardiovascular

Os esteroides anabolizantes androgênicos são compostos naturais ou sintéticos, formados a partir da testosterona e seus derivados⁴⁹. Estas substâncias são utilizadas no tratamento de diferentes patologias, proporcionando melhorias nas condições de saúde, quando administrados corretamente⁵⁰. A utilização terapêutica dos esteroides anabolizantes é indicada para o tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos, na recuperação de cirurgias e atrofia muscular. Por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra e reduzindo o aumento de tecido adiposo, estas drogas são utilizadas também no tratamento do câncer de mama, osteoporose e anemias⁵¹⁻⁵⁴.

No âmbito esportivo os esteroides anabolizantes são utilizados por atletas profissionais e amadores com o objetivo de melhorar o desempenho físico através dos ganhos obtidos na força e massa muscular, além de visarem uma melhora na aparência física⁵⁴⁻⁵⁸.

Apesar dos esteroides anabolizantes serem indicados para o tratamento de muitas patologias, o uso indiscriminado destas substâncias provoca várias alterações deletérias em muitos sistemas orgânicos, em especial aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular como hipertrofia do ventrículo esquerdo, infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, arritmia e morte súbita⁵⁹⁻⁶³.

Os estudos que investigaram os efeitos dos esteroides anabolizantes em atletas fisiculturistas e levantadores de peso tem demonstrado um aumento na massa cardíaca quando comparado a não usuários. Krieg et al.⁶⁴ investigaram em atletas praticantes de exercícios de força as alterações cardíacas provocadas pelos esteroides anabolizantes através de uma análise ecocardiográfica. No estudo de Krieg et al.⁶⁴ foi observado um aumento no índice de massa ventricular e septo interventricular, além de um prejuízo na função diastólica associada à redução no pico de velocidade durante a fase inicial de enchimento diastólico. Em relação à função sistólica não foram verificadas alterações. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, Pearson et al.⁶⁵ e De Piccoli et al.⁶⁶ observaram prejuízo na função diastólica em levantadores de peso que utilizavam esteroides anabolizantes, quando comparados aos que não os usavam.

Karila et al.⁶⁷, verificaram aumentos em alguns parâmetros ecocardiográficos de usuários de esteroides anabolizantes quando comparado com não usuários. A massa do ventrículo esquerdo, massa do ventrículo esquerdo corrigido pela massa corporal, espessura do septo interventricular, espessura da parede posterior do ventrículo

esquerdo e o diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole foram significativamente maiores nos usuários de esteroides anabolizantes. Em contrapartida, a função diastólica não apresentou diferenças significativas quando os grupos foram comparados. Corroborando com estes resultados, Hartgens et al.⁶⁸ também não observaram prejuízos na função diastólica de atletas de força que utilizaram esteroides anabolizantes.

Os efeitos hipertróficos dos esteroides anabolizantes em humanos parecem ser um consenso, porém os prejuízos sobre a função ventricular é controverso⁶⁷ e vai depender em parte da metodologia, dos tipos e dosagens de esteroides anabolizantes usados⁶⁹.

Nesta linha de raciocínio, convém mencionar o estudo de Urhausen et al.⁵ que demonstraram, através de exames ecocardiográficos, que o remodelamento cardíaco observado em atletas de força usuários de esteroides anabolizantes não é reversível.

Os estudos com animais seguem a mesma tendência dos realizados com humanos, nos quais após a utilização destas substâncias é possível verificar a presença de hipertrofia cardíaca. Beutel et al.⁷⁰ demonstraram em ratos, um aumento na relação peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal total, após oito semanas de tratamento com o esteroide anabolizante Stanozolol. Os autores demonstraram efeitos hipertróficos tanto com a utilização de baixa dose (5mg/Kg/semana) quanto com a utilização de alta dose (20mg/Kg/semana) de Stanozolol.

Investigando os efeitos do treinamento de natação, realizado cinco vezes por semana, associado ao tratamento com DN (15mg/kg), Soares et al.⁷¹ após 12 semanas de tratamento, demonstraram não haver alterações no peso do coração. Porém, verificaram aumento no diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo nos ratos que treinaram com natação, enquanto a espessura da parede ventricular esquerda aumentou nos ratos sedentários tratados com DN e nos ratos treinados e tratados com DN. Os autores concluíram que o treinamento de natação aumentou o diâmetro da cavidade ventricular esquerda, enquanto o tratamento com DN aumentou a espessura da parede ventricular esquerda, sugerindo uma hipertrofia concêntrica.

Carmo et al.⁸ demonstraram que a associação de esteroides anabolizantes (10mg/kg/semana) com o treinamento de natação provoca alterações na morfologia cardíaca e perda de função ventricular em ratos, após 10 semanas de tratamento experimental. Os autores observaram hipertrofia cardíaca de 38% no grupo de ratos sedentários que usaram anabolizantes, 52% no grupo treinamento controle e 64% no grupo treinamento e anabolizante. No entanto, quando analisada a fração volume de

colágeno, os grupos que receberam o tratamento com anabolizantes apresentaram aumento significativo em relação aos grupos que não utilizaram. Os autores não observaram diferenças significativas na função sistólica entre os grupos estudados, no entanto o grupo que recebeu esteroides anabolizantes associados ao treinamento de natação apresentou diminuição da função diastólica em relação aos outros grupos. Assim, os resultados obtidos com a associação de esteroides anabolizantes e treinamento físico aeróbio promoveram hipertrofia cardíaca patológica, caracterizada pelo aumento do colágeno intersticial e diminuição da função diastólica.

Rocha et al.⁶ demonstraram que ratos tratados com esteroides anabolizantes apresentaram hipertrofia cardíaca em relação ao grupo controle. Quando a utilização de esteroides anabolizantes foi acompanhada pelo treinamento de natação, a hipertrofia cardíaca foi ainda maior, ocasionando perda dos efeitos benéficos induzidos pelos exercícios físicos na função ventricular. Os resultados encontrados por Rocha et al.⁶ demonstram que a associação de exercícios físicos com esteroides anabolizantes aumenta a concentração de colágeno cardíaco que está associado a maior ativação do sistema renina angiotensina cardíaco.

Utilizando um modelo de TR para ratos, Tanno et al.⁷² investigaram a interação entre o esteroide anabolizante DN e o TR. Os animais receberam duas doses semanais de DN (5mg/kg), durante seis semanas, e o programa de TR de alta intensidade consistia de saltos na água, realizado cinco vezes por semana, durante seis semanas. Tanno et al.⁷², demonstraram que o TR e o tratamento com DN provocam hipertrofia ventricular esquerda, associada a mudanças na geometria do ventrículo esquerdo, disfunção sistólica e diastólica, além de estimular a re-expressão de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca patológica, evidenciando o impacto maléfico da associação entre DN e TR no sistema cardiovascular. A hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo foi evidenciada através dos aumentos que ocorreram na espessura da parede ventricular e na massa do ventrículo esquerdo corrigido pela massa corporal dos grupos TR, TR mais DN e não treinado mais DN. Estes efeitos foram mais pronunciados no grupo TR mais DN. Os resultados ecocardiográficos obtidos no estudo de Tanno et al.⁷², demonstram que o DN isoladamente ou combinado com o TR induz uma hipertrofia patológica concêntrica, evidenciado por um decréscimo no débito cardíaco e um aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico. Estas adaptações maléficas encontradas nos grupos que utilizaram DN podem reduzir o suprimento sanguíneo dos órgãos e músculos. Tanno et al.⁷², demonstraram também que o tratamento com DN,

induz um aumento no conteúdo de colágeno do miocárdio. Assim as disfunções ventriculares observadas estão relacionadas com o remodelamento estrutural do miocárdio e particularmente com o desenvolvimento de fibrose miocárdica.

3.3 Hipertrofia cardíaca

Ao longo da vida, o coração sofre transformações ligadas ao processo natural de crescimento, maturidade e envelhecimento ou como resposta a situações locais ou sistêmicas que requerem alteração na força contrátil⁷³.

O miocárdio dos mamíferos passa por um crescimento hipertrófico durante a maturação pós-nascimento, que é caracterizado por aumento no tamanho individual dos cardiomiócitos sem divisão celular^{74,75}. Esse padrão de desenvolvimento hipertrófico pode ser reiniciado no coração adulto em resposta a alterações hemodinâmicas e/ou neuro-hormonais^{75,76}.

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo do miocárdio a sobrecargas hemodinâmicas crônicas e tem como substrato fundamental a hipertrofia dos cardiomiócitos⁷⁷. O crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos decorre de aumento quantitativo das proteínas estruturais e contráteis, mas durante o estabelecimento da hipertrofia são também re-expressos genes característicos da vida fetal como algumas isoformas de proteínas contráteis, o fator natriurético atrial e a enzima conversora da angiotensina I, o que confere características fenotípicas de imaturidade à célula hipertrófica⁷⁸.

O aumento da carga hemodinâmica sobre o coração acarreta em alterações estruturais e funcionais. As alterações estruturais incluem hipertrofia dos cardiomiócitos existentes e adição de sarcômeros, juntamente com um aumento no tecido conjuntivo, levando a um aumento geral da massa ventricular⁷⁹. É observado também em cardiomiócitos hipertróficos um número maior de mitocôndrias e núcleo celular aumentado⁸⁰.

Neste sentido observa-se que o padrão de hipertrofia está relacionado com a natureza do estímulo⁸⁰. Em resposta ao aumento da pressão, como as que ocorrem em situações de hipertensão arterial e estenose aórtica, a força contrátil precisa aumentar. Adicionalmente, há um aumento da tensão de parede do miocárdio onde os cardiomiócitos se submetem a um maior trabalho e se hipertrofiam⁷³. Como consequência a parede se espessa, enquanto o volume da cavidade ventricular fica reduzido⁸¹. Desse modo, ocorre uma hipertrofia na qual o comprimento de cada célula

não se altera muito, mas sim sua espessura, refletindo um aumento dos sarcômeros em paralelo (figura 1), situação conhecida como hipertrofia concêntrica^{73,75,81}.

Em situações onde o bombeamento cardíaco não é efetivo, tais como na miocardite ou na insuficiência valvar, há uma sobrecarga de volume, onde o sangue permanece mais na cavidade ventricular a qual termina sofrendo dilatação. Nesta situação, os cardiomiócitos também se hipertrofiam na tentativa de diminuir o estresse sobre a parede ventricular e manter o fluxo sanguíneo. Assim os cardiomiócitos sofrem aumento no seu comprimento, com predomínio de adição de sarcômeros em série (figura 1), situação denominada de hipertrofia excêntrica que é caracterizada por uma dilatação na cavidade ventricular^{73,75,80,81}.

Figura 1 - Hipertrofia excêntrica (sobrecarga de volume) e concêntrica (sobrecarga de pressão). Adaptada de Garcia e Incerpi⁷⁵.

A hipertrofia cardíaca é geralmente considerada um indicativo de mau prognóstico e está associada a quase todas as formas de insuficiência cardíaca⁸². A insuficiência cardíaca é uma doença debilitante, que aumenta a incidência hospitalizações e eleva a taxa de mortalidade⁸³. Por outro lado, o aumento no tamanho do coração, em decorrência dos exercícios físicos, não está associado com insuficiência cardíaca. O treinamento físico também induz uma resposta hipertrófica, mas isso está associado à função cardíaca preservada ou aumentada^{45,84}.

O coração responde às diversas situações em que é submetido, sendo capaz de aumentar ou diminuir suas dimensões. O aumento do tamanho do coração depende da sobrecarga que recebe e da duração do estímulo, resultando em hipertrofia cardíaca que pode ser fisiológica ou patológica⁸⁵. As hipertrofias cardíacas patológicas e fisiológicas

são causadas por diferentes estímulos, funcionalmente distinguíveis, e estão associadas a fenótipos estruturais e moleculares distintos⁸⁶.

A hipertrofia cardíaca patológica ocorre em resposta a hipertensão arterial, valvulopatias, infarto do miocárdio e mutações genéticas^{87,88} e pode por fim, progredir para a insuficiência cardíaca⁸⁹.

Por outro lado, a hipertrofia fisiológica ocorre em resposta a atividade física regular ou treinamento físico crônico^{79,84,90} e está associada à função cardíaca normal ou aumentada⁸⁹. Em resposta ao treinamento físico regular, o coração pode sofrer remodelamento cardíaco, isto é, mudanças na geometria ventricular esquerda para melhorar o desempenho. O fenótipo resultante é referido como "coração do atleta", mais frequentemente observado em atletas de elite que participam de regimes regulares de treinamento de alta intensidade⁸⁹.

Convém destacar que a hipertrofia fisiológica mantém um fluxo coronário normal, preserva a capacidade vasodilatadora com distribuição homogênea do fluxo sanguíneo entre o endocárdio e o pericárdio, tanto em repouso, quanto durante o exercício. Além de não promover alterações irreversíveis no interstício, consolidando o padrão de reversibilidade deste processo, uma vez que decorre de adaptações fisiológicas⁹¹.

Diferentes métodos de treinamento provocam alterações distintas no coração de atletas. Morganroth et al.⁹² foram os primeiros estudiosos a relatar diferenças morfológicas em corações de atletas praticantes de TR quando comparado aos corações de atletas adeptos de exercícios de resistência aeróbia.

Esportes de resistência aeróbia como o ciclismo, corrida, natação e triatlo apresentam um predomínio de componentes dinâmicos e envolvem o movimento de grandes grupos musculares^{86,90}. Os atletas de resistência aeróbia sustentam longos períodos com frequência cardíaca alta, volume sistólico e débito cardíaco elevado, e um moderado aumento da pressão arterial média^{90,93}. Desta forma, os exercícios de resistência aeróbia proporcionam uma elevada sobrecarga de volume ao coração e um aumento no retorno venoso, como consequência, o coração precisa se adaptar à carga de trabalho imposta pela modalidade esportiva. Assim, o coração responde aumentando o diâmetro interno do ventrículo esquerdo e a espessura da parede ventricular esquerda^{45,90,94}. Desta forma, novos sarcômeros são adicionados em série aos sarcômeros existentes⁹⁰.

O TR envolve o incremento de tensão muscular contra resistência com pouco movimento⁸⁶. Deste modo, o TR impõem exigências ao coração que são semelhantes às que ocorrem nos exercícios isométricos ou estáticos. Nestes exercícios o volume de ejeção do coração não é afetado, mas a sobrecarga é caracterizada por elevações acentuadas na pressão arterial sistólica e diastólica e modesto aumento do débito cardíaco, frequência cardíaca e consumo de oxigênio^{28,90}. O TR de alto nível está associado a respostas pressóricas súbitas e grandes^{28,32}. Devido ao aumento da pós-carga, é necessária uma alta pressão intraventricular para abrir a válvula aórtica. Durante a fase de ejeção, os altos níveis de pós-carga e pressão intraventricular levam a um aumento do estresse da parede miocárdica, que é o principal estímulo para a hipertrofia cardíaca com sobrecarga de pressão⁹⁵. O coração responde a sobrecarga de pressão imposta pelo TR, adicionando novos sarcômeros aos sarcômeros existentes⁹⁰. Deste modo, hipertrofia cardíaca concêntrica ocorre em resposta da sobrecarga de pressão, que é caracterizada por um espessamento das paredes do ventrículo esquerdo e mínima dilatação da cavidade ventricular⁸⁹.

Figura 2 - Remodelamento cardíaco fisiológico e patológico. Adaptada de Weeks e McMullen⁸⁹.

3.4 Matriz extracelular do miocárdio (colágeno)

A matriz extracelular do miocárdio está intimamente ligada à função contrátil do coração, por estar envolvida na sustentação dos cardiomiócitos e vasos sanguíneos, contribuindo para manter a arquitetura do tecido e a geometria do coração⁹⁶. Os principais componentes da matriz extracelular cardíaca são os diferentes tipos de moléculas de colágeno, proteoglicanos, fibronectina e elastina, além de outras glicoproteínas, muitas delas associadas ao glicocálice dos cardiomiócitos^{81,97}.

A rede de tecido conjuntivo formada principalmente por colágeno distribui as forças de trabalho do miocárdio, influencia a complacência ventricular e serve como estrutura de suporte durante o crescimento e na regeneração do miocárdio⁹⁸.

Avaliações morfométricas indicam que o coração de um adulto apresenta aproximadamente 2 a 4% de colágeno no miocárdio^{97,99}. Como o colágeno é um material relativamente rígido com alta resistência à tração, que está em contato íntimo com todos os outros componentes do miocárdio, ele desempenha um papel crucial na manutenção da forma, tamanho e função ventricular, pequenas alterações em sua concentração podem exercer efeitos marcantes nas propriedades mecânicas passivas do coração^{97,100}.

O termo colágeno é usado para nomear uma família de proteínas presentes principalmente na localização extracelular, assumindo um papel importante na biologia dos tecidos. O colágeno do miocárdio consiste em uma rede de fibras que está intimamente conectada aos cardiomiócitos. A maioria das fibras de colágeno encontra-se paralelamente aos cardiomiócitos e tem uma aparência ondulada, esticada ou enrolada¹⁰¹.

Na composição da matriz extracelular do miocárdio são encontradas fibras de colágeno dos tipos I, III, IV e V^{98,102}, no entanto, as fibras de colágeno dos tipos I e III são o principal componente da matriz extracelular cardíaca^{101,103,104}. Aproximadamente 85% do colágeno do miocárdio é do tipo I, enquanto o colágeno do tipo III, representa 11% do total de colágeno no coração^{105,106}.

Em relação a localização das fibras de colágeno nos tecidos e órgãos, o colágeno do tipo I é distribuído principalmente nas cápsulas de órgãos, nos tendões, na derme, ossos, cartilagem fibrosa e na dentina. O colágeno do tipo III é particularmente abundante no útero, artérias e músculos. A função do colágeno do tipo I é fornecer resistência à tensão ao passo que o colágeno do tipo III proporciona a manutenção da estrutura em órgãos expansíveis.

Na microscopia de luz polarizada, as fibras de colágeno do tipo I apresentam-se espessas, fortemente birrefringentes, na coloração amarela ou vermelha, enquanto as fibras de colágeno do tipo III são finas, fracamente birrefringentes e assumem uma coloração esverdeada^{101,107}.

Estruturalmente, existem três componentes da rede de colágeno que, de acordo com a terminologia do músculo esquelético, foram nomeados de epimísio, perimísio e endomísio (figura 3)¹⁰⁸. O epimísio é uma bainha de tecido conectivo que envolve todo o coração ele está localizado nas superfícies endocárdica e epicárdica, o endomísio circunda as células miocárdicas individuais e o perimísio envolve os feixes de fibras musculares cardíacas^{96,101,104}.

Figura 3 - Representação esquemática da rede de colágeno do miocárdio. Adaptada de Eghbali e Weber¹⁰⁴.

Robinson et al.¹⁰⁹ ao estudarem o epimísio disposto nos músculos papilares, descobriram que, à medida que o músculo é estirado, o alinhamento das fibras de colágeno epimisiais torna-se mais paralela ao eixo das fibras musculares cardíacas. Uma vez que o alinhamento do colágeno é paralelo ao músculo, o estiramento adicional do músculo leva a um aumento exponencial da tensão passiva. Assim, o epimísio age como um elemento elástico paralelo que protege os cardiomiócitos e seus sarcômeros de serem estendidos.

O perimísio é uma extensão do epimísio e consiste em tendões ondulados ou fibras de colágeno enroladas que se situam entre os feixes de fibras musculares¹⁰⁴. As

fibras de colágeno muitas vezes têm uma configuração torcida, provavelmente para ter maior resistência à tração¹⁰¹.

Na composição do endomísio, encontra-se um combinado de fibras de colágeno do tipo I e III¹¹⁰. Essas fibras são responsáveis por fazer a conexão lateral dos cardiomiócitos, que estão amarrados geralmente nas proximidades da linha Z^{101,104}.

A degradação do colágeno miocárdico tipicamente resulta em dilatação ventricular e uma diminuição na rigidez ventricular, enquanto um aumento na concentração de colágeno e ou a sua reticulação, resulta em um miocárdio mais rígido com disfunção ventricular diastólica. O colágeno intersticial no miocárdio não é uma proteína estática e mudanças no equilíbrio entre a síntese e a degradação podem levar a alterações na composição da rede de colágeno no coração. Além da concentração de colágeno, o comportamento passivo do miocárdio também pode depender das proporções relativas dos tipos de colágeno, do diâmetro das fibras de colágeno e de seu alinhamento espacial e do grau de reticulação⁹⁷. Assim, tecido contendo predominantemente colágeno tipo I, fibras de colágeno de grande diâmetro e ou alto grau de reticulação será mais rígido do que tecido composto por maiores concentrações de fibras do tipo III, fibras de colágeno de diâmetro relativamente pequeno e essencialmente sem colágeno reticulado^{97,111}.

3.5 Ultraestrutura do tecido muscular

O tecido muscular consiste em células alongadas chamadas de fibras musculares, que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis, geradoras das forças necessárias para a contração desse tecido e que usa ATP para produzir força^{107,112}. Conforme sua localização e determinadas características funcionais e estruturais, o tecido muscular é classificado em três tipos: estriado esquelético, estriado cardíaco e liso¹¹².

O tecido muscular é responsável pelo movimento do corpo e por mudanças no tamanho e no formato dos órgãos internos. Caracteriza-se por agregados de células alongadas e especializadas, dispostas em arranjos paralelos, cuja principal função é a contração¹¹³.

Cada fibra muscular é preenchida com subunidades estruturais dispostas longitudinalmente, denominadas miofibrilas que estendem-se em todo o comprimento da célula muscular (figura4)¹¹³.

Figura 4 - Fibra muscular e miofibrila. Adaptada de Junqueira e Carneiro¹⁰⁷.

As miofibrilas consistem em feixes de filamentos de proteína denominados de miofilamentos. Os miofilamentos mais abundantes são os filamentos finos compostos principalmente de actina e filamentos espessos compostos, sobretudo de miosina¹¹⁴. A unidade funcional da miofibrila é o sarcômero, em cada extremidade do sarcômero os filamentos finos estão ligados à linha Z também chamada de disco Z¹¹³.

A banda A é a região do sarcômero que contém os filamentos espessos, os filamentos finos estendem-se da linha Z até a região da banda A^{113,114}.

A linha M conecta a porção central de cada filamento espesso, é formada por ligações laterais entre filamentos grossos adjacentes, que são importantes para a manutenção correta do filamento no sarcômero^{107,114}.

Em um sarcômero em repouso, a banda H (faixa H) é uma região mais clara em ambos os lados da linha M. A banda H contém somente filamentos espessos¹¹⁴.

Cada banda I apresenta apenas filamentos finos e se estende entre a banda A de um sarcômero até a banda A do próximo sarcômero. No interior do sarcômero as linhas Z marcam o limite entre os sarcômeros adjacentes¹¹⁴.

Figura 5 - Figura esquemática de um segmento miofibrilar. Fonte: Abrahamsohn¹¹⁵.

Figura 6 - Micrografia eletrônica de transmissão do músculo esquelético, evidenciando as estruturas do sarcômero. Fonte: Brelje e Sorenson¹¹⁶.

3.6 Alterações ultraestruturais do miocárdio em decorrência dos esteroides anabolizantes andrógenos

A utilização de esteróides anabolizantes andrógenos a longo prazo ou em doses excessivas, têm sido associado a distúrbios cardiovasculares que incluem mudanças de nível bioquímico, fisiológico e estrutural. Alguns relatos de danos ultraestruturais em decorrência da utilização de esteroides anabolizantes já foram descritos anteriormente¹¹⁷⁻¹²³.

Elgendy et al.¹²² investigaram o efeito de diferentes doses de esteroides anabolizantes na morfologia cardíaca de ratos. O estudo teve duração de oito semanas,

onde os ratos foram divididos em diferentes grupos, que receberam doses distintas de DN 5, 10 e 20 mg/kg semanalmente. No final do experimento, foi observado a presença de hipertrofia cardíaca nos grupos tratados com DN quando comparado ao grupo controle.

As observações no músculo cardíaco realizadas por Elgendy et al.¹²² através da microscopias eletrônicas de transmissão, demonstram dano em determinadas área do miocárdio que variam de mínimo a grave, de acordo com a dose de nandrolona utilizadas. Nos ratos tratados com 5mg/kg de DN foi evidenciado perda do padrão de uniformidade na espessura das miofibrilas, áreas focais de fragmentação e lise de miofibrilas, rompimento da linha Z e divisão de algumas fibrilas. Algumas mitocôndrias estavam inchadas e vacuoladas, bem como se evidenciou acúmulo de mitocôndrias inchadas sob o sarcolema e entre as miofibrilas. Foi observado também um contorno irregular do núcleo com aglomerados de heterocromatina e retículo sarcoplasmático dilatado.

As eletromicrografias do miocárdio dos ratoa tratados com 10mg/kg de DN evidenciaram áreas focais de lise, divisão, destruição e degeneração de algumas miofibrilas, ruptura da linha Z e no disco intercalar. As mitocôndrias estavam pleomórficas, inchadas e acumuladas sob o sarcolema e entre as miofibrilas, algumas mitocôndrias estavam destruídas e vacuoladas. O retículo sarcoplasmático estava dilatado, quanto ao núcleo este se encontrava na periferia com contorno irregular e aglomeração de sua heterocromatina.

No miocárdio dos ratos tratados com 20mg/kg de DN foi observado desorganização e lise das miofibrilas, distúrbios na arquitetura normal das miofibrilas com extensa destruição e desorganização, interrupção e dano do disco intercalar. As mitocôndrias estavam inchadas, pleomórficas e vacuoladas, algumas se apresentavam sob o sarcolema. O retículo sarcoplasmático estava dilatado e algumas áreas sarcoplasmáticas apresentavam rarefação. Alguns núcleos estavam dispostos na periferia com irregularidade no seu contorno. Foi observada também a presença de capilar sanguíneo congestionado e dilatado.

As lesões histopatológicas no músculo cardíaco de ratos, tratados com DN, evidenciadas no estudo de Elgendy et al.¹²² foram seguidas de um aumento na expressão da caspase-3, indicando a presença de apoptose nas células cardíacas.

Papamitsou et al.¹¹⁹ investigaram os efeitos do EAA Enantato de testosterona no músculo cardíaco de ratos. Os animais foram tratados durante vinte dias com 10 mg da

droga. A microscopia eletrônica de transmissão revelou alterações significativas nas células do miocárdio. Foram encontradas mitocôndrias edematosas nas células miocárdicas, juntamente com algum grau de edema intracelular. A análise quantitativa das mitocôndrias demonstrou no grupo que recebeu testosterona, que estas são maiores e mais arredondadas que as mitocôndrias dos animais do grupo controle. Foi observado também um desarranjo nos sarcômeros, com desorganização das miofibrilas e na linha Z. Entre os capilares e as células do miocárdio, foram observadas fibras de colágeno, que são uma indicação de fibrose miocárdica.

O estudo imuno-histoquímico realizado por Papamitsou et al.¹¹⁹ indica apoptose como sendo a causa da destruição das estruturas do miocárdio. A coloração miocárdica positiva para caspase-3 é um indicador da ativação da cascata de apoptose após a administração de testosterona em ratos. A apoptose provoca a perda de células miocárdicas e finalmente, a depressão do desempenho miocárdico. O abuso de EAA tem sido causalmente ligado à morte súbita cardíaca, infarto do miocárdio, remodelação ventricular e cardiomiopatia. Estes eventos estão relacionados com a ativação da apoptose devido o abuso de EAA¹¹⁹.

Seguindo a mesma linha de trabalho do presente estudo, Soliman et al.¹²¹ estudaram os efeitos do tratamento de quatro semanas com 10 mg/kg de DN no músculo cardíaco de ratos. Para tanto, no final das quatro semanas de experimento, metade dos animais foram sacrificados e a outra metade ficou sem tratamento por mais duas semanas. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão revelaram no grupo tratado com DN, retículo sarcoplasmático dilatado, destruição das miofibrilas e da membrana mitocondrial, marcante desorganização do disco intercalar com quase separação dos dois cardiomiócitos, aparência anormal do núcleo com cromatina perifericamente condensada e corrugada na membrana e houve aumento na quantidade de fibras de colágeno no endomísio que se apresentava alargado.

No grupo tratado com DN, sacrificado duas semanas após o término do tratamento, foi observado que algumas das miofibrilas restauraram sua aparência normal, mas a maioria delas ainda estava degenerada, houve distribuição anormal de mitocôndrias degeneradas, desorganização dos discos intercalares, perturbação do padrão normal das bandas de miofibrilas e o núcleo mostrou-se anormal com cromatina marginalmente condensada¹²¹.

Diante do exposto Soliman et al.¹²¹ concluíram que a administração crônica de doses supra-fisiológicas de DN teve efeito tóxico no músculo cardíaco de ratos, e este efeito é parcialmente reversível após a interrupção do tratamento.

De forma semelhante ao estudo de Soliman et al.¹²¹ o experimento de Abdelhafez¹²⁰ investigou os efeitos de 10mg/kg DN no coração de ratos. O estudo teve a duração de três meses, onde uma parte dos animais foi sacrificada um dia após o término do tratamento e o restante dos animais foi sacrificado trinta dias após o término do tratamento. Os resultados da microscopia eletrônica nos ratos sacrificados um dia após o fim do experimento revelaram endomísio dilatado, alterações na parede dos vasos sanguíneos, que continham hemácias com formas anormais. Os núcleos dos cardiomiócitos exibiram várias alterações degenerativas. Algumas mitocôndrias apresentavam variação no tamanho, com ruptura da crista e das membranas. Destruição do sarcolema e miofibrilas, aumento de fibras colágenas e grânulos de glicogênio no endomísio, também foram observados.

Após trinta dias de tratamento com nandrolona, o músculo cardíaco exibiu destruição, fragmentação e lise de algumas miofibrilas, linha Z interrompida, numerosas mitocôndrias elétron-densas com núcleos degenerados e picnóticos. Alguns grânulos de glicogênio foram dispersos em torno de muitas mitocôndrias e entre as miofibrilas, mas a maioria dos flocos e grânulos de glicogênio foi observada perto da borda da célula¹²⁰.

Para Abdelhafer¹²⁰ o período de recuperação de trinta dias após o tratamento com DN não proporcionou melhora na arquitetura do músculo cardíaco. Para o autor, estas descobertas dão suporte e confirmam que doses suprafisiológicas de EAA são responsáveis por induzir hipertrofia cardíaca e não os níveis fisiológicos naturais de testosterona, que devido à presença de receptores androgênicos nos miócitos cardíacos poderiam mediar uma hipertrofia significativa.

No estudo de Mahmoud et al.¹²³, os ratos foram tratados durante quatro semanas com 10 mg/kg de DN, o que apresentou marcantes alterações histológicas, ultraestruturais e histoquímicas no músculo cardíaco quando comparado com o grupo controle que não recebeu o medicamento. O exame de microscopia eletrônica do grupo tratado com DN confirmou os resultados observados no microscópio de luz. O músculo cardíaco exibiu destruição, fragmentação e lise de algumas miofibrilas e núcleos picnóticos com envelope nuclear irregular. Fibras de colágeno aumentadas foram observadas no endomísio, discos intercalados distribuídos irregularmente foram demonstrados entre os cardiomiócitos adjacentes. O estudo imuno-histoquímico do

miocárdio dos ratos tratados revelou uma reação citoplasmática positiva para a caspase-3 nos cardiomiócitos, indicando a presença de apoptose em decorrência do tratamento com DN.

Para investigar o efeito dos EAA, nas células musculares cardíacas de ratas, Behrendt e Boffin¹²⁴ aplicaram uma vez por semana 1,65 mg/kg de Metandrostenolona (Dianabol), durante três semanas. Os resultados encontrados foram divididos pelos autores em três grupos. No primeiro grupo, os autores enfatizam que a maioria das células investigadas foi composta de miofibrilas, normalmente dispostas com um sarcômero medindo aproximadamente 2,2 μm de comprimento. As mitocôndrias demonstraram serem maiores que o normal e estavam alinhadas entre duas miofibrilas adjacentes. Segundo, um pequeno número de células do músculo cardíaco mostrou um arranjo irregular dos miofilamentos com um aglomerado de mitocôndrias redondas e inchadas. As bandas Z dentro de uma miofibrila estavam extremamente irregulares na sua forma. Terceiro, um número muito pequeno de células do músculo cardíaco do ventrículo esquerdo, e às vezes apenas partes de células isoladas, mostraram um padrão desintegrado de miofilamentos sem sarcômeros formados. As bandas Z estavam agrupadas e apareciam como manchas densas. Às vezes, os filamentos finos formavam uma rede com filamentos grossos interpostos e nenhum ribossomo foi detectado nessas áreas. As mitocôndrias eram um tanto alongadas, com uma matriz esparsa e poucas cristas e o espaço extracelular nas adjacências dessas células ocupado por feixes de fibrilas de colágeno, que separavam as células do miocárdio umas das outras, indicando fibrose.

As alterações ultraestruturais que foram encontradas são consideradas comparáveis às descritas nos estágios iniciais da insuficiência cardíaca¹²⁴. As modificações celulares encontradas no estudo de Behrendt e Boffin¹²⁴ incluem tanto alterações no aparelho contrátil, isto é, no sarcômero, e/ou distúrbios na unidade energética da célula, ou seja, na mitocôndria. É geralmente aceito que o dano no sistema mitocondrial e o armazenamento de lipídios são características de uma diminuição em sua capacidade funcional, indicando um metabolismo celular desequilibrado na hipertrofia precoce¹²⁵, no entanto, essas alterações precoces diminuem em fases posteriores da hipertrofia¹²⁴. De acordo com Behrendt e Boffin¹²⁴, as mudanças na estrutura dos elementos contráteis como distorções e espessamentos da banda Z ou alongamento da banda I, até sarcômeros completamente destruídos, podem representar lesões autênticas.

Com o objetivo de investigar os efeitos do treinamento físico e dos EAA, bem como a combinação de ambos em nível estrutural Appell et al.¹²⁶, estudaram os volumes relativos e os compartimentos funcionais das células do músculo cardíaco. Para tanto, os animais foram divididos em grupo controle, grupo treinamento, grupo EAA e grupo treinamento mais EAA. Os animais treinados correram 30 minutos em uma esteira rolante, cinco vezes por semana, durante quatro semanas. Os animais tratados com EAA, após as quatro semanas de tratamento, receberam no total 3,75 mg de Metandrostenolona (Dianabol).

Ao final do experimento o miocárdio do grupo controle mostrou uma estrutura normal. Em contrapartida, todos os demais grupos apresentaram uma dilatação acentuada do espaço sarcoplasmático. As mitocôndrias eram de tamanho e forma diferente, a estrutura miofibrilar foi alterada em alguns casos, em especial no grupo EAA mais treinamento, onde as miofibrilas pareciam estar isoladas pela quantidade de mitocôndrias e sarcoplasma ao seu entorno. As análises morfométricas demonstraram nos grupos experimentais um aumento significativo no volume sarcoplasmático, cerca de 50 vezes o valor do grupo de controle. Por conseguinte, houve uma diminuição acentuada no volume das miofibrilas de todos os grupos experimentais. A quantidade relativa de mitocôndria não modificou, mas a área e o diâmetro máximo das mitocôndrias aumentaram em todos os grupos experimentais. O índice mitocôndria/miofibrila aumentou consideravelmente em todos os grupos experimentais, sugerindo um desequilíbrio entre os volumes de ambas as estruturas funcionais em favor das mitocôndrias¹²⁶.

O estudo patológico das imagens obtidas na microscopia eletrônica realizado por Appell et al.¹²⁶ também forneceu evidências de aumento no tamanho das mitocôndrias, bem como foi demonstrado uma hipertrofia das miofibrilas em todos os grupos experimentais. Os autores relatam alterações importantes encontradas no grupo treinamento mais EAA, tais como: espaço sarcoplasmático estendido apresentando muitas organelas, que normalmente estão envolvidas na condensação de proteínas intracelulares. As miofibrilas foram destruídas ou alteradas. Além disso, ocorreu o surgimento de miofibrilas aberrantes que não foram orientadas paralelamente ao padrão fibrilar normal, mas cruzaram a maioria das fibrilas em vários ângulos. Focalmente, os discos intercalares foram desintegrados, e finalmente, algumas células eram necróticas e apresentavam edema intracelular.

Em conclusão Appell et al.¹²⁶ afirmam que os EAA e o treinamento exercem efeitos sobre os componentes celulares, todavia apresentam influências distintas na proliferação mitocondrial. Se o treinamento e os EAA forem combinados, as células são alteradas patologicamente, portanto isso é a consequência do uso indevido de EAA nos esportes.

Hassan et al.¹¹⁸, estudaram a estrutura do coração de ratos que foram tratados semanalmente com 10 mg/kg de undecanoato de testosterona, durante oito semanas. Ao término do período de tratamento, o exame ultraestrutural revelou que as fibras musculares cardíacas apresentavam alguns núcleos contraídos, com cromatina condensada. O sarcoplasma demonstrou degeneração e mitocôndrias destruídas, as bandas do sarcômero apresentavam perturbação do padrão, com dissolução completa das unidades sarcoméricas em algumas áreas. As miofibrilas apresentavam desintegração com perda de estriações, alguns discos intercalares estavam abertos e algumas bandas Z estavam interrompidas. O sarcômero na área perinuclear continha retículo endoplasmático liso dilatado, ribossomos livres e corpo multivesicular, que apresentava um formato de arredondado a oval.

Para os autores, as alterações ultraestruturais que foram encontradas nos cardiomiócitos de ratos que usaram EAA, são semelhantes aos observados na insuficiência cardíaca precoce. Isto pode fornecer uma explicação para o aumento na taxa de morte súbita de origem desconhecida em atletas que fazem uso de EAA. Estes resultados confirmaram que o uso destes medicamentos está associado a muitos efeitos deletérios sobre o miocárdio, tanto a nível celular quanto no nível ultraestrutural¹¹⁸.

4. MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram utilizados 40 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com três meses de idade, provenientes do Biotério da Universidade de Passo Fundo/RS. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado ($\pm 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro e escuro de 12/12 horas, recebendo água e ração sem restrições. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelas comissões de ética em uso de animais das Universidades de São Paulo (protocolo 098/14) e de Passo Fundo (protocolo 016/2013).

4.2 Delineamento experimental

Inicialmente, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos (n=10), conforme o protocolo ao qual seriam submetidos:

- Controle (CO);
- Decanoato de nandrolona (DN);
- Treinamento resistido (TR);
- Treinamento resistido e Decanoato de Nandrolona (TRDN);

Decorrido um período de sete dias para aclimação e adaptação ao protocolo de treinamento, tiveram início os procedimentos relativos a cada grupo (aplicação de EAA e programa de TR). Passadas 16 semanas, 5 animais de cada grupo foram avaliados e eutanasiados, constituindo-se assim, os subgrupos^A: CO^A, DN^A, TR^A, TRDN^A. A partir desse momento, cessaram os procedimentos nos animais restantes de cada grupo que constituíram os subgrupos^B: CO^B, DN^B, TR^B, TRDN^B, que foram assim mantidos até a 28^a semana quando também foram avaliados e eutanasiados.

4.3 Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico consistiu da aplicação, duas vezes por semana, de DN (Deca-Durabolin®, Schering-plough - 5mg/kg cada aplicação) nos subgrupos DN^A, DN^B, e TRDN^A, TRDN^B, e de óleo de amendoim (0,2 ml/kg cada aplicação) nos subgrupos CO^A, CO^B, e TR^A e TR^B. As substâncias foram injetadas via intramuscular na musculatura posterior da coxa.

As doses de DN foram baseadas nos trabalhos publicados anteriormente^{7,127,128} e podem ser comparadas com doses frequentemente utilizadas por atletas em processo de dopagem: 700mg/semana ou aproximadamente 10 mg/kg⁻¹ por semana⁵⁸. A dose utilizada na presente pesquisa foi equivalente a 100 vezes a dosagem terapêutica¹²⁹.

4.4 Protocolo de Treinamento

O TR foi adaptado de modelos anteriormente descritos na literatura^{130–132}. Desta forma, foi utilizada uma escada confeccionada em madeira, com degraus de ferro, medindo 110 cm de altura, 25 cm de largura e uma inclinação de 80°, cujo topo encontrava-se uma caixa para acomodação dos animais (Figura 7). Os animais escalavam a escada com objetivo de alcançar a área de descanso. Uma semana antes do início do treinamento os animais foram adaptados ao equipamento, onde cada animal realizou sete escaladas ao dia.

As sessões de exercícios foram realizadas cinco dias por semana, durante 16 semanas. O TR consistiu de escaladas com intervalo de 45 segundos, sendo que para imprimir uma sobrecarga, foi adicionado um peso na parte proximal da cauda do animal, fixado com auxílio de fita adesiva, fecho mosquetão e argolas. O programa de treinamento foi periodizado em oito microciclos, com aumentos de forma linear nas sobrecargas de volume e intensidade. A cada microciclo, os animais foram pesados para readequação da sobrecarga (Tabela 1).

Figura 7 – Aparato de treinamento, adaptado de Nascimento et al.¹³²

Tabela 1 – Periodização e protocolo de treinamento resistido

Microciclo	Semana	Volume (escaladas)	Intensidade (% massa corporal)
1°	1 ^a	7	70%
	2 ^a	7	
2°	3 ^a	7	80%
	4 ^a	7	
3°	5 ^a	7	90%
	6 ^a	7	
4°	7 ^a	7	100%
	8 ^a	7	
5°	9 ^a	7	110%
	10 ^a	7	
6°	11 ^a	7	120%
	12 ^a	7	
7°	13 ^a	7	130%
	14 ^a	7	
8°	15 ^a	7	140%
	16 ^a	7	

4.5 Análise morfofuncional por ecocardiografia com Doppler

As avaliações ecocardiográficas morfofuncionais foram realizadas por um único observador, na décima segundas e na vigésima quarta semana de experimento, nos animais do subgrupo^A e subgrupo^B, respectivamente.

Para realização das avaliações, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (80mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg). Após a sedação realizou-se a tricotomia do tórax, em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral, em uma mesa apropriada para o posicionamento do transdutor no tórax. Foi utilizado o equipamento de ecocardiografia com Doppler Esaote® MyLab 70, com transdutor de 9 MHz. Durante a realização do exame foi utilizado gel de transmissão na extremidade do transdutor, a fim de permitir a penetração do feixe ultrassonográfico. Foram coletadas três medidas consecutivas de cada variável, sendo posteriormente calculada a média.

Figura 8 – Ecocardiografia transtorácica (MyLab 70 Esaote ®)

As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia¹³³. Após a observação do ventrículo esquerdo através de um corte transversal no nível dos músculos papilares, a visualização do modo M foi efetuada para obtenção de medidas morfométricas: diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole (DVED), diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole (DVES), espessura da parede posterior na sístole (EPPS), espessura da parede posterior na diástole (EPPD), espessura do septo interventricular na diástole (ESD), espessura do septo interventricular na sístole (ESS). A função sistólica foi determinada pela fração de ejeção (FEJ) e fração de encurtamento (FEN).

O estudo do fluxo transmitral, realizado no Doppler, foi utilizado para determinar a função diastólica através do: pico de velocidade da onda A (Pico A) e pico de velocidade da onda E (Pico E).

Figura 9 - (A) Avaliação morfológica através do modo M. (B) - avaliação da função diastólica através do Doppler

4.6 Eutanásia

Após a décima sexta e a vigésima oitava semana, os animais dos subgrupos^A e ^B respectivamente, foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com uma mistura de ketamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg). Constatado o óbito dos animais, a cavidade torácica foi aberta e um fragmento de 0,5mm do ápice cardíaco foi removido e imediatamente imerso em solução fixadora de Karnovski modificada para microscopia eletrônica de transmissão (Vide item 4.10.3).

4.7 Índice de hipertrofia cardíaca

Após a eutanásia, os corações dos animais foram removidos da cavidade torácica e mantidos em solução fixadora de formol a 10%, durante sete dias. Findo o período de fixação, os corações foram dissecados para retirada do ventrículo esquerdo que foi pesado em uma balança eletrônica (Marte ® modelo AS1000C). O índice de hipertrofia cardíaca foi estimado para cada animal, calculando a relação entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal.

4.8 Microscopia de luz

Um segmento transversal da parte média de cada coração foi utilizado para as análises em microscopia de luz. Os fragmentos do miocárdio já fixados em formol 10% foram desidratados em séries crescentes de álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, seccionados em cortes de 6µm de espessura e corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE) e picro-sirius¹³⁴.

Os cortes corados com HE foram analisados em microscópio de luz (Carl Zeiss Axioscope 40) com aumento de 40x. Cinco cortes do ventrículo esquerdo de cada animal, selecionados aleatoriamente, foram utilizados. Nestes cortes, foram fotografados cinco campos visuais, distribuídos de forma equidistante. Desta forma, de cada animal foram fotografados vinte cinco campos, totalizando 125 campos visuais em cada grupo.

4.9 Avaliação estereológica do coração

4.9.1 Volume do ventrículo esquerdo

A fim de determinar o volume do ventrículo esquerdo foi utilizado o princípio de Cavalieri^{135,136}. De acordo com a metodologia, foram obtidas secções do ventrículo

esquerdo com 2 mm de espessura (Figura 10), avaliadas sob lupa binocular acoplado a um sistema de análise de imagens (Axiovision 4.8 – Zeiss ®). Sobre as imagens assim processadas, foi sobreposta uma grade de pontos, que permitiu obter o volume da parede e do lúmen do ventrículo esquerdo, utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$V(P): \sum pp \times a(p) \times t$$

$$V(L): \sum pl \times a(p) \times t$$

Onde:

$V(P)$: volume da parede do ventrículo esquerdo.

$\sum pp$: somatório de pontos que tocaram a parede do ventrículo esquerdo.

$a(p)$: área por ponto: 208 mm^2 (para a parede do ventrículo esquerdo).

t : espessura do corte 2mm.

$V(L)$: volume do lúmen.

$\sum pl$: somatório de pontos que tocaram o lúmen.

$a(p)$: área por ponto: 25 mm^2 (para o lúmen).

t : espessura do corte 2 mm.

O volume total do ventrículo esquerdo (VT) foi obtido somando o volume da parede do ventrículo esquerdo com o volume do lúmen.

Figura 10 - Ilustração do fluxo de trabalho para determinar os volumes da parede do ventrículo esquerdo, do lúmen e volume total do ventrículo esquerdo. As sete fatias foram colocadas com o mesmo lado para cima (A), uma grade de pontos é colocado sobre as amostras e os pontos que atingem a superfície de corte de cada fatia são contados e somados (B)

4.9.2 Densidade de volume das fibras musculares cardíaca (FMC) e do interstício cardíaco (IC).

Para determinar o V_v das FMC e IC foi sobreposto às imagens obtidas das lâminas coradas pela HE, um sistema de 405 pontos equidistantes, como ilustra a figura 11. Os dados obtidos foram aplicados a formula, previamente descrita^{137,138}:

$$V_v(\text{FMC}) = \sum p(\text{FMC}) / \sum p(\text{P})$$

$$V_v(\text{IC}) = \sum p(\text{IC}) / \sum p(\text{P})$$

Onde:

$\sum p(\text{FMC})$: somatório de pontos que tocam a fibra muscular cardíaca.

$\sum p(\text{IC})$: somatório de pontos que tocam o interstício cardíaco.

$\sum p(\text{P})$: somatório de pontos que tocam todos os estratos.

4.10 Avaliação morfológica do coração

4.10.1 Espessura dos cardiomiócitos

Com o uso do sistema de imagens anteriormente descrito, foram selecionados nos cortes corados pela HE, cardiomiócitos com núcleos visíveis, onde através de uma reta passando pelo seu centro, foi determinada a dimensão transversal da célula (Figura 12).

Figura 11 – Imagem ilustrativa demonstrando o sistema teste

Figura 12 - Determinação da dimensão transversal (espessura) de cardiomiócitos

4.10.2 Evidenciação e tipificação das fibras de colágeno através do método de Picrosirius

A avaliação qualitativa das fibras colágenas foi realizada em dois cortes de três animais por grupo, as fibras colágenas foram avaliadas em três campos, conforme ilustra a figura 13, os cortes foram corados pelo método histológico de Picrosirius e

avaliados sob luz polarizada¹³⁴. A distribuição e a densidade de fibras colágenas dispostas no epicárdio e no interior do miocárdio foram estudadas.

Figura 13 - Corte transversal da parte média do ventrículo esquerdo, onde se evidenciam os campos: anterior (A), lateral (L) e posterior (P) determinados para a avaliação qualitativa das fibras colágenas.

4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise sob MET foram utilizados fragmentos de 0,5mm do ápice do coração descritos no item 4.6, fixados na solução de Karnovski modificada contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído a 0,1 M de tampão fosfato de sódio em pH 7,3. Vinte e quatro horas após, os fragmentos foram imersos por duas horas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato de sódio, os fragmentos de cada espécime foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% por duas horas a 4°C. Depois de corados com acetato uranila (overnight), desidratados em série crescente de álcoois (60% até 100%), os fragmentos foram incluídos em resina pura. Cortes semifinos (400nm) foram corados com azul de toluidina, a fim de selecionar as áreas adequadas para os cortes ultrafinos (60nm), que foram contrastados com cetato de uranila a 4%¹³⁹ e citrato de chumbo a 0,4%¹⁴⁰ e dispostos em tela de cobre de 200 “mesh” para análise ao microscópio eletrônico de transmissão. Foram analisadas as características ultraestruturais das bandas musculares do sarcômero e mitocôndrias.

4.11 Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória dos dados, a fim de verificar os pressupostos essenciais para utilização de testes paramétricos. Uma vez que algumas variáveis não apresentaram distribuição normal, foi adotado o teste de Kruskal-Wallis nas variáveis não paramétricas e o teste ANOVA One-way nas variáveis com

distribuição normal. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos, foram utilizados os testes de Dunn e Bonferroni nos testes não paramétrico e paramétrico, respectivamente. Foi estabelecido como valor significativo $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Pesos (corporal e ventrículo esquerdo) índice de hipertrofia cardíaca

A figura 14 apresenta os gráficos com os resultados do peso corporal dos ratos, subgrupos^A gráfico A e subgrupos^B gráfico B. Foi observado diferença estatisticamente significativa somente nos subgrupos^B, onde os animais do grupo TRDN^B diminuíram o peso corporal em relação ao grupo CO^B. No peso do ventrículo esquerdo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (figura 15). A estimativa de hipertrofia cardíaca demonstrada através da relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal é visualizada na figura 16. A relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, subgrupo A, foi significativamente maior no grupo TRDN^A quando comparado aos resultados dos grupos CO^A e TR^A. O mesmo comportamento foi observado no subgrupo B, a relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal foi maior no grupo TRDN^B em comparação aos grupos CO^B e TR^B.

A

B

Figura 14 - Peso corporal, gráfico (A) subgrupos^A. Gráfico (B) subgrupos^B, *diferença significativa em relação ao CO^B P<0,05

A

B

Figura 15 - Peso do ventrículo esquerdo, gráfico (A) subgrupos^A. Gráfico (B) subgrupos^B

A

B

Figura 16 - Relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, gráfico (A) subgrupos^A; *diferença significativa em relação ao CO^A e TR^A P<0,01. Gráfico (B) subgrupos^B; *diferença significativa em relação ao CO^B P<0,05 e TR^B P<0,01.

5.2 Análises estereológicas e morfométricas

Os resultados da morfometria dos cardiomiócitos são observados na figura 17. No gráfico A que demonstra os dados dos subgrupos^A foi observado uma elevação na espessura dos cardiomiócitos dos animais que fizeram uso de DN pertencentes aos grupos DN^A e TRDN^A as diferenças foram em relação aos grupos CO^A e TR^A. Diferenças significativas foram observadas também entre os grupos TRDN^A e DN^A.

Resultados dos subgrupos^B são visualizados no gráfico B, a espessura dos cardiomiócitos dos grupos DN^B, TR^B e TRDN^B foi maior que a observada no grupo CO^B. Os cardiomiócitos dos animais pertencentes aos grupos TR^B e TRDN^B são mais espessos que os cardiomiócitos encontrados nos animais do grupo DN^B. Diferenças significativas foram observadas também entre os grupos TRDN^B e TR^B.

A

B

Figura 17 - Espessura dos cardiomiócitos, gráfico (A) subgrupos^A; *diferença significativa em relação ao CO^A, TR^A P<0,05; # diferença significativa em relação ao DN^A P<0,05. Gráfico (B) subgrupos^B; *diferença significativa em relação ao CO^B P<0,05; # diferença significativa em relação ao DN^B P<0,05; † diferença significativa em relação ao TR^B.

Nos subgrupos^A foram observadas alterações nas densidades de volume dos cardiomiócitos (figura 18 gráfico A) e interstício (figura 19 gráfico A). Uma diminuição na densidade de volume dos cardiomiócitos foi observada no grupo de animais treinados TR^A, ao passo que a densidade de volume do interstício destes animais foi significativamente maior. Nenhuma alteração nas densidades de volume foi observada nos subgrupos^B (figuras 18, 19 gráficos B).

Os volumes do ventrículo esquerdo são demonstrados nas tabelas 2 e 3, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tanto nos subgrupos^A quanto nos subgrupos^B.

A

B

Figura 18 - Vv (cardiomiócitos), gráfico (A) subgrupos^A. *diferença significativa em relação ao TR^A $P < 0,01$. Gráfico (B) subgrupos^B.

A

B

Figura 19 - Vv (interstício) gráfico (A) subgrupos^A; *diferença significativa em relação ao TR^A $P < 0,01$; # diferença significativa em relação ao TR^A $P < 0,05$. Gráfico (B) subgrupos^B.

Tabela 2 – Volumes do ventrículo esquerdo - subgrupos^A

Parâmetros	Grupos			
	CO ^A	DN ^A	TR ^A	TRDN ^A
V(P)	71,55±7,39	72,17±7,27	72,45±8,08	76,12±10,50
V(L)	11,44±2,06	9,97±2,48	10,98±2,16	9,75±1,51
VT	82,99±7,94	83,60±7,39	79,74±6,48	85,87±11,17

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; V(P) volume da parede do ventrículo esquerdo; V(L) volume do lúmen; VT volume total do ventrículo esquerdo.

Tabela 3 – Volumes do ventrículo esquerdo - subgrupos^B

Parâmetros	Grupos			
	CO ^B	DN ^B	TR ^B	TRDN ^B
V(P)	77,87±7,27	85,52±11,24	71,05±5,52	79,12±5,55
V(L)	10,06±2,54	12,28±2,71	9,22±1,36	10,94±1,65
VT	87,93±9,37	97,81±13,12	80,27±5,15	90,06±6,71

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; V(P) volume da parede do ventrículo esquerdo; V(L) volume do lúmen; VT volume total do ventrículo esquerdo.

5.3 Avaliação morfofuncional do ventrículo esquerdo determinado por ecocardiografia.

As análises morfológicas obtidas por ecocardiografia dos subgrupos^A e ^B são visualizadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros morfológicos obtidos através de ecocardiografia.

Os resultados da função cardíaca sistólica e diastólica determinados por ecocardiografia, estão apresentados na tabela 6 subgrupos^A e tabela⁷ subgrupos^B. De forma semelhante às análises morfológicas não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros da função cardíaca determinada por ecocardiografia.

Tabela 4 - Parâmetros morfológicos determinados por ecocardiografia subgrupos^A

Parâmetros	Grupos			
	CO ^A	DN ^A	TR ^A	TRDN ^A
DVED (mm)	6,14±1,70	5.85±0,32	5.76±0,80	5.65±1,39
DVES (mm)	3,86±1,48	3,56±0,36	3,45±0,83	3.31±0,87
EPPS (mm)	3,06±0,33	3.01±0,16	3,13±0,43	3,16±0,28
EPPD (mm)	2,56±0,35	2,26±0,38	2,55±0,30	2,40±0,71
ESD (mm)	2,38±0,65	1,85±0,30	2,21±0,46	1,91±0,44
ESS (mm)	2,92±0,55	2,60±0,36	2,78±0,40	2,85±0,42

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; DVED, Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DVES, Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; EPPS, Espessura da parede posterior na sístole; EPPD, Espessura da parede posterior na diástole; ESD, Espessura do septo na diástole; ESS, Espessura do septo na sístole.

Tabela 5 - Parâmetros morfológicos determinados por ecocardiografia subgrupos^B

Parâmetros	Grupos			
	CO ^B	DN ^B	TR ^B	TRDN ^B
DVED (mm)	6,12±0,56	6.02±0,66	6,00±0,70	5.84±0.83
DVES (mm)	3,72±0,83	3,44±0,66	2,76±0,13	3,18±0,29
EPPS (mm)	3,26±0,67	4.48±0,67	3,92±0,67	4,40±0,86
EPPD (mm)	2,90±0,34	3,74±1,03	2,88±0,66	3,46±1,29
ESD (mm)	1,90±0,64	1,96±0,20	1,80±0,36	2,06±0,13
ESS (mm)	2,88±0,80	2,90±0,72	2,84±0,35	2,44±0,16

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; DVED, Diâmetro do ventrículo Esquerdo na diástole; DVES, Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; EPPS, Espessura da parede posterior na sístole; EPPD, Espessura da parede posterior na diástole; ESD, Espessura do septo na diástole; ESS, Espessura do septo na sístole.

Tabela 6 – Parâmetros fisiológicos determinados por ecocardiografia - subgrupos^A

Parâmetros	Grupos			
	CO ^A	DN ^A	TR ^A	TRDN ^A
Função sistólica				
FEJ (%)	74,00±9,89	75,50±5,01	76,50±7,25	78,00±4,19
FEN (%)	38,40±7,92	39,33±4,32	40,33±6,31	41,33±4,36
Função diastólica				
Pico A (m/s)	0,32±0,07	0,34±0,06	0,28±0,06	0,30±0,08
Pico E (m/s)	0,63±0,16	0,49±0,05	0,57±0,10	0,47±0,04

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; FEJ, Fração de ejeção; FEN, Fração de encurtamento; Pico A, Pico de velocidade da onda A; Pico E, Pico de velocidade da onda E.

Tabela 7 – Parâmetros fisiológicos determinados por ecocardiografia - subgrupos^B

Parâmetros	Grupos			
	CO ^B	DN ^B	TR ^B	TRDN ^B
Função sistólica				
FEJ (%)	75,00±9,69	77,00±13,39	88,60±4,61	81,60±5,59
FEN (%)	39,40±8,32	42,60±13,68	53,80±6,34	45,20±6,09
Função diastólica				
Pico A (m/s)	0,39±0,12	0,37±0,05	0,32±0,05	0,32±0,04
Pico E (m/s)	0,72±0,12	0,60±0,08	0,62±0,12	0,53±0,03

Os valores são expressos em média ± desvio padrão; FEJ, Fração de ejeção; FEN, Fração de encurtamento; Pico A, Pico de velocidade da onda A; Pico E, Pico de velocidade da onda E.

5.4 Aspectos qualitativos

5.4.1 Análise do colágeno

Com relação ao colágeno do miocárdio, as imagens comparativas dos subgrupos^A são visualizadas na figura 20. O epicárdio, em ambos, os grupos é composto predominantemente por fibras de colágeno do tipo I. Ao comparar as imagens, é possível verificar diferença na espessura da camada de colágeno que compõem o epicárdio. Nos animais dos grupos DN^A e TRDN^A o epicárdio é mais delgado em comparação ao encontrado nos grupos CO^A e TR^A. Nos campos tracejados, onde se destacam a distribuição e a densidade de fibras colágenas espessas do tipo I e delgadas do tipo III, verifica-se o predomínio das fibras do tipo I no grupo DN^A, e do tipo III no grupo TR^A.

Figura 20 - Fotomicrografia de parte da parede do ventrículo esquerdo de animais dos subgrupos^A evidenciando as fibras colágenas (A- grupo CO^A; B- grupo TR^A; C- grupo DN^A; D- grupo TRDN^A). (Picro-sirius sob luz polarizada. Barra de Calibração: 100µm).

O comportamento das fibras de colágeno dos animais dos subgrupos^B é demonstrado na figura 21. O epicárdio em ambos os grupos é composto predominantemente por fibras de colágeno do tipo I. Ao comparar as imagens, é possível verificar diferença na espessura da camada de colágeno que compõem o epicárdio. Nos animais dos grupos DN^B e TRDN^B o epicárdio é mais espesso em comparação ao encontrado nos grupos CO^B e TR^B. Nos campos tracejados, onde se destacam a distribuição e a densidade de fibras colágenas espessas do tipo I e delgadas

do tipo III, verifica-se o predomínio das fibras do tipo I nos grupos CO^B e TRDN^B, e do tipo III nos grupos TR^B e DN^B.

Figura 20 - Fotomicrografia de parte da parede do ventrículo esquerdo de animais dos subgrupos^B evidenciando as fibras colágenas (A- grupo CO^B; B- grupo TR^B; C- grupo DN^B; D- grupo TRDN^B). (Picro-sirius sob luz polarizada. Barra de Calibração: 100µm)

5.4.2 Ultraestrutura dos cardiomiócitos

Sob microscopia eletrônica de transmissão, as análises comparativas dos subgrupos^A são visualizadas na figura 22. Relativamente aos animais CO^A verificou-se um arranjo normal das miofibrilas, dispostas paralelamente e separadas entre si por fileiras de mitocôndrias de formato heterogêneo. A organização em sarcômeros é nítida, onde se verifica a sua disposição entre as linhas Z; no centro da banda A é visível a linha M e a banda H. (figura 22, A),

No grupo DN^A há uma aparente diminuição no tamanho dos sarcômeros, com espessamento da linha Z. As miofibrilas, em menor densidade, exibem uma desorganização, estando ausentes em alguns sarcômeros. Nesses animais, são característicos o formato irregular das mitocôndrias e a menor densidade das cristas mitocondriais, bem como a dilatação dos túbulos T (Figuras 22, B-C).

No miocárdio do grupo TR^A, embora as mitocôndrias se apresentem com volume aumentado e com cristas irregulares, o aspecto do sarcômero e das miofibrilas aproxima-se do verificado para o grupo CO^A (Figura 22, D).

As alterações estruturais no miocárdio dos animais TRDN^A caracterizaram-se pela degeneração dos miofilamentos em diversos sarcômeros, e linhas Z curvas e espessadas. Em muitas fibras, essas linhas estão dispostas de forma oblíqua, e até mesmo rompidas em alguns trechos. As características das mitocôndrias desse grupo são comparáveis àquelas descritas para o grupo DN^A (Figuras 22, E-F).

Figura 21 – Microscopia eletrônica de transmissão (2500X) do miocárdio dos ratos dos subgrupos^A. Imagem A grupo CO^A, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem B e C grupo DN^A, sarcômero (seta dupla) aparentemente apresenta um comprimento reduzido com dissolução dos miofilamentos, os miofilamentos estão destruídos (seta em curva), linha Z espessa (seta), na imagem B as mitocôndria (M) estão redondas e inchadas e há uma aparente dilatação do sarcoplasma, banda H e linha M são pouco visíveis (cabeça de seta) o retículo endoplasmático está dilatado (cruz). Imagem D grupo TR^A, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem E e F grupo TRDN^A, sarcômero (seta dupla), linha Z espessa (seta), linha Z em forma de curva (asterisco), aparente ruptura da linha Z (círculo) mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta)

Os resultados encontrados non subgrupos^B são demonstrados na figura 23. Desta forma, no miocárdio dos animais CO^B as miofibrilas estão organizadas em paralelo no interior do sarcômero delimitado pelas linhas Z e com aspecto normal. Com exceção da banda I, todas as demais estruturas são bem evidenciadas (Bandas A, H, e linha M) (Figura 23, A).

No grupo DN^B há uma heterogeneidade quanto ao comprimento dos sarcômeros, bem como uma diminuição aparente na densidade das miofibrilas. Foram detectados espaços nos sarcômeros sugestivos de perda dessas estruturas. A linha Z, afilada nesse grupo, em determinadas fibras encontrava-se destruída. Não foram detectadas alterações importantes tanto no formato das mitocôndrias, como na densidade das cristas mitocondriais (Figuras 23, B-D).

Quando comparado ao grupo CO^B, os animais TR^B caracterizaram-se por apresentar sarcômero de aspecto regular e alongado, e linhas Z com menor eletrondensidade (Figura 23, E).

O comprimento e a espessura dos sarcômeros dos animais TRDN^B são heterogêneos. Embora tenham sido observados sarcômeros com densidade normal de miofibrilas, alguns se apresentaram com aparente dano estrutural, tanto das miofibrilas, como da linha Z. Nesse grupo, há um aumento no volume das mitocôndrias (Figuras 23, G-H).

Figura 22 – Microscopia eletrônica de transmissão (25000x), do miocárdio dos ratos dos subgrupos^B. Imagem A grupo CO^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M), banda H e linha M (cabeça de seta). Imagem B, C e D grupo DN^B, os sarcômero aparentemente apresentam dissolução das miofibrilas, linha Z afilada (seta), banda H e linha M (cabeça de seta), mitocôndria (M); na imagem B um sarcômero é curto de forma anormal (seta dupla), linha Z em forma de curva (asterisco); na imagem C os filamentos estão destruídos (seta em curva); na imagem D aparente destruição da linha Z (círculo). Imagem E grupo TR^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), mitocôndria (M). Imagem F, G e H grupo TRDN^B, sarcômero (seta dupla), linha Z (seta), banda H e linha M (cabeça de seta); na imagem F os sarcômeros apresentam dissolução das miofibrilas, filamentos estão destruídos (seta em curva), aparente destruição da linha Z (círculo); na imagem G um sarcômero é curto de forma anormal (seta dupla), linha Z em forma de curva (asterisco); nas imagens G e H as mitocôndria estão hipertrofiadas (M).

6. DISCUSSÃO

Após 16 semanas de tratamento nos subgrupos^A, não foram verificadas alterações no peso corporal dos animais nos diferentes grupos. Estudos anteriores já demonstraram manutenção^{7,141,142}, redução^{70,71,128,143,144} e ganho de peso corporal após o tratamento com EAA¹⁴³.

A redução do peso corporal pode estar ligada à diminuição no apetite dos ratos tratados com DN, resultando em um menor ganho de peso¹⁴⁵. Woodiwiss et al.¹²⁸ sugerem que as influências autonômicas neuro-humorais podem ser responsáveis por uma redução do apetite e, por conseguinte, do peso corporal. Por sua vez, o tratamento com EAA pode causar um aumento no metabolismo do tecido adiposo¹⁴⁶.

Hassan e Kamal¹⁴⁶ verificaram uma diminuição da gordura intra-abdominal dos ratos que foram tratados com DN. Resultados similares foram observados por Schroeder et al.¹⁴⁷, que observaram uma redução na gordura abdominal de idosos tratados com EAA. Pereira Junior et al.¹⁴¹ não atribuem a perda de peso corporal ao efeito estimulante lipolítico dos EAA, tendo em vista que, em seu laboratório, um estudo não revelou redução na gordura peritoneal de ratos sedentários tratados com DN.

Convém destacar, que o acompanhamento das flutuações que ocorrem no peso corporal dos animais é de grande importância, pelo fato de que algumas variáveis são corrigidas pelo peso corporal. De tal forma, uma diminuição ou elevação no peso corporal pode influenciar nos resultados encontrados.

Levando em consideração que o peso do coração está diretamente relacionado com o peso corporal^{74,148}, em estudos experimentais tem sido adotado o produto da divisão do peso do coração pelo peso corporal, como um índice para determinar a presença de hipertrofia cardíaca^{6,7,142,149}.

Os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas no peso do coração. Por outro lado, quando o peso do ventrículo esquerdo foi corrigido pelo peso corporal, um aumento significativo na relação peso do VE/peso corporal, utilizada como índice de hipertrofia cardíaca, foi observado nos animais dos grupos TRDN^A.

Neste aspecto, estudos prévios que utilizam a relação peso do coração/peso corporal tem demonstrado a presença de hipertrofia cardíaca em ratos exercitados com TR³⁹ e tratados com EAA^{7,143,144}.

Andrade et al.⁷ verificaram, através da relação peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, a presença de hipertrofia cardíaca. Os animais do estudo de Andrade et al.⁷ foram tratados semanalmente com 10 mg/kg de DN durante quatro semanas.

De forma semelhante, os ratos do estudo de Franquni et al.¹⁴⁴ que foram tratados semanalmente com 20 mg/kg de DN, durante quatro semanas, apresentaram uma elevação no índice de hipertrofia cardíaca (peso do VE/peso corporal) em relação ao grupo controle. O tratamento com DN também induziu hipertrofia significativa dos cardiomiócitos, que foi constatado pelo aumento na área dos núcleos dos cardiomiócitos e na redução no número de núcleos de cardiomiócitos por campo.

O programa de TR aplicados por Barauna et al.³⁹ em animais de laboratório, indicou a presença de hipertrofia cardíaca após quatro semanas de TR. A relação peso do VE/Peso corporal foi aproximadamente 12% maior no grupo de ratos praticantes de exercícios resistidos em relação ao grupo controle. Esta tendência foi confirmada em estudo posterior de Barauna et al.⁴ que verificaram a presença de hipertrofia cardíaca em ratos exercitados com TR. A massa do ventrículo esquerdo e a espessura dos cardiomiócitos, após três meses de treinamento, aumentaram 16% e 14,1%, respectivamente, em relação ao grupo controle.

Por outro lado, no estudo Gonçalves et al.¹⁴² não foram verificadas alterações significativas em alguns indicadores de hipertrofia cardíaca. Os animais do estudo foram tratados com o EAA Propionato de testosterona, e treinados um programa de TR de 16 semanas, semelhante ao utilizado no presente estudo (exercícios de escalada em uma escada). Ao final do experimento, não foram verificaram alterações significativas no peso do ventrículo esquerdo e na relação peso do VE/peso corporal dos ratos.

O treinamento físico pode induzir diversas respostas adaptativas sobre o sistema cardiovascular, entre elas, a hipertrofia cardíaca, que ocorre de forma simétrica sendo considerada uma adaptação benéfica ao sistema cardiovascular⁸.

As alterações morfológicas no coração dependem do tipo de treinamento e são clinicamente caracterizadas por modificações no tamanho e na forma do coração devido ao aumento da carga⁹⁰. Os exercícios mais dinâmicos, realizados em intensidades moderadas, de forma cíclica, proporcionam ao coração uma sobrecarga de volume resultando em hipertrofia excêntrica. Por outro lado o TR, que apresentam características mais isométricas proporcionam uma sobrecarga de pressão sobre o coração, que acaba ocasionando hipertrofia de padrão concêntrico^{43,44,74,90}.

Entretanto, quando o treinamento físico é associado ao uso de EAA tem sido observado mudança da hipertrofia cardíaca fisiológica, induzida pelo exercício, para patológica, caracterizada por alterações morfológicas, estruturais e funcionais no coração⁸.

No presente estudo, de acordo com as análises morfométricas da espessura dos cardiomiócitos, observa-se que os animais dos grupos DN^A e TRDN^A apresentaram hipertrofia cardíaca. Como esperado, observamos maior hipertrofia cardíaca no grupo TRDN^A em relação ao grupo DN^A, uma vez que os efeitos dos EAA na morfologia cardíaca são mais pronunciados quando sua administração é combinada com exercícios físicos⁹⁸. O exercício físico está associado a alterações hemodinâmicas que modificam as condições de trabalho do coração, desempenhando um potente estímulo hipertrófico, mas a magnitude e o padrão da hipertrofia ventricular esquerda dependem da natureza, duração e intensidade do exercício^{44,45,90,150}.

A hipertrofia cardíaca, verificada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos nos grupos DN^A e TRDN^A, não foi acompanhada de alterações nos volumes e diâmetros do ventrículo esquerdo, que foram avaliados de forma direta e indiretamente através das análises estereológicas e ecocardiográficas, respectivamente. Nossos resultados referentes às dimensões cardíacas condizem, em parte, com o esperado para praticantes de TR. Atletas exercitados com TR apresentam um espessamento na parede do ventrículo esquerdo sem aumento significativo na cavidade ventricular⁴⁴.

Em resposta ao treinamento físico regular, o coração pode sofrer remodelamento cardíaco para melhorar o desempenho. O fenótipo resultante é referido como "coração de atleta" é mais frequentemente observado em atletas de elite que participam de treinamentos regulares de alta intensidade⁸⁹. Esta adaptação fisiológica ajuda o miocárdio a suportar as crescentes demandas de exercício, mantendo ou melhorando a função cardíaca¹⁵¹.

A hipertrofia cardíaca fisiológica é caracterizada pela organização normal da estrutura cardíaca e função cardíaca preservada ou aumentada, enquanto a hipertrofia cardíaca patológica é comumente associada à fibrose, disfunção cardíaca e aumento da mortalidade⁸⁶.

Portanto, para avaliar a presença de hipertrofia fisiológica ou patológica, as funções sistólica e diastólica foram avaliadas por meio da ecocardiografia com Doppler. Não houve diferenças significantes em relação aos resultados da função sistólica e diastólica entre os grupos. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores nos

quais não foram observadas alterações da função sistólica de animais tratados com EAA^{8,58}. Dados semelhantes também foram encontrados em humanos, onde foi observado por ecocardiografia aumento de massa cardíaca em usuários de EAA não sendo notadas alterações da função sistólica^{64,68,152}. Por outro lado, alguns estudos em animais relatam a presença de disfunção diastólica em decorrência da utilização de EAA, sugerindo hipertrofia cardíaca patológica^{8,58,72}.

A este respeito, o estudo de Carmo et al.⁸ demonstrou que ratos treinados e tratados com DN apresentaram diminuição nas variáveis da função diastólica, pico de velocidade da onda E e relação E/A, quando comparado aos demais grupos do estudo, indicando uma possível disfunção diastólica. O pico de velocidade da onda E corresponde à fase de enchimento rápido do ventrículo e o pico de velocidade da onda A corresponde à fase de enchimento lento, ou contração atrial. Em uma ecocardiografia normalmente o valor do pico de velocidade da onda E é maior do que pico de velocidade da onda A, mas em situações de disfunção diastólica esses valores se invertem. Em algumas situações patológicas o aumento do pico de velocidade da onda A está acompanhado do aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico que indica a necessidade de um maior tempo para o relaxamento ventricular¹⁵³.

Diversos estudos em humanos, praticantes de TR (fisiculturistas e levantadores de peso) e também usuários de EAA, tem verificado um comprometimento da função diastólica em decorrência da utilização de EAA^{64–66,154}. Em geral, os resultados indicam claramente que o TR a longo prazo, associado à administração de EAA, altera negativamente a função diastólica através de mecanismos que envolvem propriedades reduzidas de relaxamento do ventrículo esquerdo¹⁵⁴.

A este respeito os resultados ecocardiográficos obtidos no estudo de Tanno et al.⁷² evidenciam que o DN por si só ou associado ao TR induz a hipertrofia patológica, confirmada pela diminuição do débito cardíaco, e pelo aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico. Estas são adaptações maléfica que podem reduzir o suprimento de sangue para órgãos e músculos. Além disso, o DN deprimiu a função diastólica do ventrículo esquerdo, diminuindo a contribuição para o enchimento passivo do ventrículo e aumentando o enchimento ativo, ocasionando em uma queda na relação E/A. Os resultados do estudo de Tanno et al.⁷² foram ainda acompanhados de um aumento no conteúdo de colágeno no ventrículo esquerdo, assim, a disfunção ventricular esquerda observada está relacionada ao remodelamento estrutural do miocárdio e, particularmente, ao desenvolvimento de fibrose miocárdica. Nesta direção,

uma explicação plausível para as perdas na função diastólica, estão relacionadas ao aumento do colágeno intersticial, visto que o tecido conectivo é responsável por distribuir as forças de trabalho sobre o coração, exercendo uma importante influência sobre a complacência ventricular^{98,155}. Convém destacar que um aumento no conteúdo de colágeno afeta não apenas propriedades físicas do miocárdio isto é, distensibilidade diastólica, mas também leva a mudanças em seu comportamento eletrofisiológico⁶⁴, facilitando o surgimento de taquicardia, o que explica as repetidas ocorrências de morte súbita em usuários de EAA¹⁵⁶.

Neste particular, fortes indícios associam a utilização de EAA ao aumento do conteúdo de colágeno no miocárdio^{6,8,72}. Em seu estudo Takala et al.⁹⁸, observaram em cães, que a interação entre exercícios físicos e EAA, eleva a atividade da enzima prolyl 4-hydroxylase e conseqüentemente provoca um aumento na concentração de colágeno no coração.

De acordo com os resultados encontrados no estudo de Do Carmo et al.⁵⁸, o tratamento com DN isoladamente ou associado ao treinamento físico de natação aumentou significativamente a fração volume de colágeno do miocárdio de ratos. O aumento do conteúdo de colágeno foi acompanhado também por um aumento significativo na expressão gênica do colágeno tipo III nos animais tratados com DN. Por outro lado, a expressão gênica relativa ao colágeno tipo I não apresentou diferenças entre os grupos estudados.

Estudo bastante semelhante foi desenvolvido por Rocha et al.⁶, quando o colágeno cardíaco dos grupos de ratos tratados com DN ou treinados (natação) e tratados com DN foi investigado e uma quantidade maior de colágeno no ventrículo esquerdo foi encontrada. O grupo de animais treinados e tratados com DN apresentou um aumento na expressão gênica cardíaca do colágeno tipo I e tipo III, em comparação ao grupo que treinou somente.

Em contraposição, o estudo de Woodiwiss et al.¹²⁸ demonstrou que a concentração de colágeno do ventrículo esquerdo não foi alterada pelo treinamento físico, pela administração de DN (5 mg/kg aplicado quinzenalmente) ou por sua combinação. Além do mais, a proporção de colágeno tipo I e III foram as mesmas em todos os grupos estudados. De forma semelhante, no estudo de Trifunovic et al.¹⁵⁷ nem a concentração de colágeno, a razão de colágeno tipo I para III, nem a solubilidade do colágeno, um índice de reticulação, foi alterada apenas pela administração de EAA.

No presente estudo, as análises morfo-qualitativas do colágeno demonstraram o predomínio de fibras de colágeno do tipo I na composição do epicárdio cardíaco. Quando comparadas as características do epicárdio nos diferentes grupos, foi evidenciado um comportamento distinto em relação à espessura da camada de colágeno que compõem o epicárdio. Nos animais dos grupos DN^A e TRDN^A o epicárdio é mais delgado em comparação ao encontrado nos grupos CO^A e TR^A.

Neste enfoque, definimos o epimísio como sendo uma camada de tecido conectivo que inclui fibras de colágeno que envolve o coração, localizado nas superfícies endocárdica e epicárdica^{101,104}. Usando o músculo papilar para estudar o epimísio, Robinson et al.¹⁰⁹ descobriram que, à medida que o músculo cardíaco é estirado, o alinhamento das fibras de colágeno epimisiais torna-se mais paralelo ao longo eixo das fibras musculares cardíacas. Uma vez que o alinhamento do colágeno é paralelo ao músculo, o estiramento adicional do músculo leva a um aumento exponencial da tensão passiva. Esta inflexão em tensão é frequentemente referida como o comprimento máximo do músculo. Assim, o epimísio age como um elemento elástico paralelo que serve para proteger os cardiomiócitos, e seus sarcômeros, de serem sobrecarregados. De uma forma especulativa torna-se possível imaginar que, uma camada mais delgada de colágeno no epicárdio (epimísio) dos animais dos grupos DN^A e TRDN^A pode contribuir para uma maior sobrecarga funcional sobre os cardiomiócitos.

Como o colágeno é um material relativamente rígido, com alta resistência à tração, pequenas mudanças em sua concentração podem exercer efeitos marcantes nas propriedades mecânicas passivas do coração⁹⁹. Além da concentração de colágeno, o comportamento passivo do miocárdio também pode depender das proporções relativas dos tipos de colágeno, do diâmetro das fibras de colágeno e de seu alinhamento espacial e do grau de reticulação⁹⁷.

Neste contexto, foi observado no miocárdio dos animais do grupo DN^A, usuários de EAA, o predomínio das fibras colágenas do tipo I. Por outro lado, no miocárdio dos animais do grupo TR^A, observou-se um predomínio de fibras colágenas do tipo III. Ao se comparar os tipos de fibras colágenas nos grupos que utilizaram DN, é evidente o predomínio das fibras espessas do tipo I no grupo DN^A e uma maior densidade das fibras do tipo III no grupo TRDN^A, onde as fibras do tipo I apresentaram-se delgadas.

Neste particular, um tecido contendo predominantemente colágeno tipo I, que apresenta fibras de grande diâmetro e/ou alto grau de reticulação será mais rígido do que

o tecido composto por maiores concentrações de fibras de colágeno do tipo III, de diâmetro relativamente pequeno e essencialmente sem colágeno reticulado¹¹¹.

De igual modo ao exposto no presente estudo, Franquni et al.¹⁴⁴ verificaram em ratos tratados semanalmente com 20mg/kg de DN, por quatro semanas, um expressivo aumento na quantidade de colágeno do tipo I no ventrículo esquerdo, a área ocupada pelas fibras colágenas do tipo I foi de 86,9 mm² e 864 mm² no miocárdio dos animais do grupo controle e usuário de DN, respectivamente.

Assim, tendo em vista a alta resistência à tração do colágeno fibrilar e sua íntima associação com os componentes funcionais do miocárdio, espera-se que o colágeno intersticial influencie o tamanho e a forma das câmaras cardíacas, assim como a função ventricular sistólica e diastólica. Portanto, não é surpreendente descobrir que modificações anormais da matriz de colágeno alteram as propriedades mecânicas miocárdicas e a função ventricular¹⁵⁸. Todavia, as modificações observadas na camada de colágeno do epicárdio dos animais que receberam DN, bem como as diferenças no padrão de distribuição das fibras colágenas do tipo I e III em alguns grupos, não foram acompanhadas de modificações no tamanho das câmaras cardíacas, assim como não observamos perdas na função sistólica e diastólica.

Os resultados ultraestruturais obtidos na microscopia eletrônica de transmissão dos subgrupos^A, revelou danos estruturais evidentes nos cardiomiócitos de rato tratados durante 16 semanas, com doses suprafisiológicas de DN. Os sarcômeros dos animais do grupo DN^A aparentaram estarem com o tamanho reduzido, as miofibrilas apresentaram uma diminuição na densidade dos miofilamentos e em determinados locais os miofilamentos estão ausentes. É evidente também a presença de um espessamento da linha Z. Em relação as mitocôndria, estas apresentam um formato arredondado e estão edemaciadas, com cristas de menor densidade, visualizam-se também mitocôndrias alongadas que chegam a comprimir as miofibrilas. Há também uma aparente dilatação dos túbulos T.

Comportamento semelhante foi observado nas ultraestruturas do miocárdio de animais treinados e tratados com DN, pertencentes ao grupo TRDN^A. Foram observados focos de destruição nos miofilamentos, as linhas Z apresentaram um espessamento e estão curvadas, em alguns sarcômeros a linha Z apresenta-se de forma oblíqua, observa-se também a ruptura em uma linha Z. Em relação às mitocôndrias, suas características são comparáveis àquelas descritas no grupo DN^A.

No miocárdio do grupo TR^A, embora as mitocôndrias se apresentem com volume aumentado e com cristas irregulares, o aspecto do sarcômero e das miofibrilas aproxima-se do verificado para o grupo CO^A.

Os estudos prévios que abordam os efeitos dos EAA na ultraestrutura do coração têm verificado alterações marcantes ao nível dos sarcômeros, mitocôndrias e no núcleo celular em animais tratados com EAA^{118,121-123}. As alterações ultraestruturais encontradas em usuários de EAA são muito semelhantes às observadas no coração de sujeito portadores de insuficiência cardíaca precoce^{118,124}. A este respeito, as alterações ultraestruturais observadas no miocárdio de ratos tratados com EAA, podem variar de mínimas a severas dependendo da dose de EAA que for utilizada¹²².

Alterações estruturais semelhantes às que ocorreram nas mitocôndrias dos animais dos grupos DN^A e TRDN^A já foram descritas. O tratamento com EAA ocasiona variações no formato e no tamanho das mitocôndrias^{118-120,122,124,126,156} além de provocar alterações na membrana^{120,121} e nas cristas mitocondriais^{118,120,124}.

Desta forma, as anormalidades na morfologia mitocondrial estão associadas principalmente a defeitos na cadeia respiratória¹²². É geralmente aceito que o dano mitocondrial e o armazenamento de lipídios são característicos de uma diminuição em sua capacidade funcional, indicando um metabolismo celular desequilibrado no início da hipertrofia¹²⁵.

Uma explicação plausível quanto às variações no tamanho das mitocôndrias encontradas no presente estudo, é demonstrada no trabalho de Appell et al.¹²⁶, quando o tamanho mitocondrial variou entre os grupos experimentais treinado e anabolizante. Assim, mitocôndrias menores como as encontradas no grupo de animais treinado foram recentemente formadas, enquanto as mitocôndrias muito grandes do grupo anabolizante se desenvolveram a partir de fusões mitocondriais ou de hipertrofia mitocondrial. No grupo treinado mais anabolizante, ambos os mecanismos podem ser combinados, isso refletiu em de mitocôndrias com tamanho intermediário.

Na opinião de Appell et al.¹²⁶ os EAA e o treinamento físico têm um efeito similar sobre os componentes celulares, mas possuem influências diferentes na proliferação mitocondrial. Se o treinamento físico e os EAA forem combinados, as células são patologicamente alteradas, que é uma consequência maléfica do abuso de EAA nos esportes.

As mudanças na estrutura dos elementos contráteis do miocárdio, observadas nos grupos DN^A e TRDN^A que fizeram uso de EAA, refletem em alterações patológicas

já descritas em usuários de EAA. Desta forma a utilização de EAA provoca perturbação do padrão e destruição dos miofilamentos^{118-124,126}, espessamento da linha Z e ruptura^{118,122,124}, dilatação no retículo sarcoplasmático^{121,122} e desorganização no disco intercalar^{118,120,122}.

Tal como no presente estudo, Schaper et al.¹⁵⁹ observaram no coração hipertrofiado de um animal com estenose aórtica congênita, sem sinais funcionais de insuficiência cardíaca, mudanças na estrutura dos elementos contráteis. Foram observadas linhas Z alargadas e torcidas que resultaram em desorganização do sarcômero, para os autores a maioria das alterações encontradas são provavelmente lesões autênticas das proteínas contráteis, representando o primeiro passo da desorganização celular em um estágio tardio da hipertrofia cardíaca. Portanto um depósito de material na linha Z e a consequente desorientação dos sarcômeros podem levar a uma diminuição da função celular, que resulta posteriormente em insuficiência cardíaca¹⁵⁹.

Alterações ultraestruturais semelhantes foram observadas por Bishop e Cole¹⁶⁰, no ventrículo direito hipertrofiado de cães, com estenose pulmonar ou dirofilariose canina, neste caso as alterações na linha Z são explicadas como sendo o início da formação de um novo sarcômero¹⁶⁰. Reforçando esta hipótese, há evidências em cardiomiócitos cultivados em cultura de tecidos, que os espessamentos da linha Z são locais de formação de novos sarcômeros¹⁶¹.

Para Elgendy et al.¹²² o dismantelamento das miofibrilas observadas no coração dos animais que utilizaram DN em seu estudo, pode ser devido à ação de uma proteinase ativada pelo cálcio no músculo necrótico. A proteinase é ativada por íon cálcio à medida que seu nível sobe até os níveis extracelulares, após a ruptura da membrana plasmática no músculo necrótico, portanto o dismantelamento ocorreu por digestão das miofibrilas e fragmentação de miofilamentos.

Por outro lado, a destruição das miofibrilas pode ter ocorrido devido a danos mitocondriais que resultam na produção inadequada de energia, que é necessária para a preservação da homeostase celular e renovação de proteínas celulares¹⁶².

Outra explicação possível justificativa para a destruição das unidades do sarcômero em usuários de EAA é a presença de apoptose nas células cardíacas. A sinalização de apoptose em células do miocárdio foi verificada, em resposta a hipóxia e isquemia¹⁶³. A este respeito, estudos prévios, sinalizam a presença de apoptose no miocárdio de animais tratados com EAA^{119,122,123}.

As lesões histopatológicas no músculo cardíaco de ratos, tratados com DN, evidenciadas no estudo de Elgendy et al.¹²², foram correlacionadas com a expressão da caspase-3, indicando a presença de apoptose nas células cardíacas. Os resultados encontrados no estudo de Elgendy et al.¹²² estão de acordo com o descrito por Papamitsou et al.¹¹⁹ que relataram em usuário de EAA aumento da imunoexpressão da caspase-3 no miocárdio de ratos. A coloração miocárdica positiva para caspase-3 é um indicador da ativação da cascata de apoptose após a administração de testosterona em ratos. A apoptose provoca a perda de células miocárdicas e finalmente a depressão do desempenho miocárdico.

O estudo dos subgrupos^A, indicou inúmeros efeitos cardiotóxicos no coração de animais usuários de DN. Nestes subgrupos a atenção foi focada nos efeitos cardiovasculares recentes que ocorreram logo após as 16 semanas de tratamento. No estudo dos subgrupos^B, a atenção foi focada nos efeitos cardiovasculares tardios que ocorreram após 12 semanas de descontinuidade do tratamento, o foco dos subgrupos^B foi analisar até que ponto os efeitos do DN são reversíveis após a interrupção do consumo desse agente.

Após a interrupção de 12 semanas, no programa de TR e no tratamento com DN, os animais dos subgrupos^B foram avaliados por ecocardiografia e posteriormente sacrificados para realização de análises histológicas e ultraestruturais no miocárdio.

Deste modo, após a descontinuidade do programa de TR e do tratamento com DN, observamos uma queda no peso corporal dos animais do grupo TRDN^B.

O menor peso corporal, observado no grupo TRDN^B pode estar relacionado com o fato do TR elevar o metabolismo basal devido um aumento na massa muscular¹⁶⁴. O gasto calórico durante a realização desta modalidade de exercícios não é muito elevado quando comparada a outras modalidades, entretanto o aumento na massa muscular devido às sobrecargas impostas aos músculos esqueléticos aumenta o gasto calórico de repouso³⁵. Apesar deste aumento não ser muito pronunciado, quando somado ao longo de semanas pode explicar o peso corporal menor dos animais do grupo TRDN^B.

Por outro lado, aumento de peso corporal após a interrupção de seis semanas no tratamento com DN foi observado no estudo de Kahal e Allem¹⁶⁵, que demonstraram também um aumento no peso do coração e alterações estruturais no miocárdio, que variaram de alongamento, dilacerações graves e rupturas das fibras musculares cardíacas que persistiram após a interrupção do tratamento com DN.

A descontinuidade do TR e do tratamento com DN não interferiu no peso do VE, porém o índice de hipertrofia cardíaca determinado pela relação peso do VE/peso corporal foi significativamente maior no grupo TRDN^B. Foi observado também, um aumento significativo na espessura dos cardiomiócitos nos grupos DN^B, TR^B e TRDN^B em relação ao grupo CO^B. Estes resultados indicam a presença de hipertrofia cardíaca nos grupos experimentais, que persistiu após a interrupção do TR e tratamento com DN.

Nessa direção, o estudo de Urhausen et al.⁵ demonstrou que o índice de hipertrofia cardíaca em ex-usuários de EAA foi semelhante ao encontrado em usuários de EAA. Urhausen et al.⁵ também demonstraram que o índice de hipertrofia cardíaca em levantadores de peso, foi significativamente menor em relação aos usuários e ex-usuários de EAA. Levando em consideração que todos os sujeitos que participaram do estudo são adeptos de TR, isto sugere não só um aumento desproporcionado do ventrículo esquerdo com a utilização de EAA, mas também hipertrofia ventricular esquerda residual que persistiu mais de um ano após a descontinuação do consumo de EAA.

Em um estudo de caso, quatro meses após a interrupção do uso de EAA, a espessura da parede do ventrículo esquerdo foi reduzida rapidamente de 12 mm para 10,5 mm e a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo aumento de 14% para 27%. Portanto, foi verificada uma reversibilidade nos efeitos dos EAA sobre o coração¹⁵⁶.

Aumentos na massa do ventrículo esquerdo em decorrência dos EAA estão bem documentados em praticantes de TR^{5,11,63,166}, assim como em animais⁷², onde um aumento da síntese proteica foi demonstrado¹⁶⁷. Receptores andrógenos estão presentes nos cardiomiócitos de várias espécies, permitindo que os EAA modulem o fenótipo cardíaco, produzindo hipertrofia cardíaca¹⁶⁸. O edema intracelular e o inchaço mitocondrial nos cardiomiócitos também pode desempenhar uma ação na hipertrofia cardíaca⁵. Nessa direção as mitocôndrias hipertrofiadas que foram encontradas no miocárdio dos animais do grupo TRDN^B, podem ter contribuído para um aumento ainda maior na espessura dos cardiomiócitos nos animais do grupo TRDN^B.

Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão nos grupos DN^B e TRDN^B demonstraram sarcômeros com dissolução e destruição total de algumas das miofibrilas. Comportamento semelhante, nas estruturas do sarcômero, foi observado por Abdelhafez¹²⁰ que após trinta dias de interrupção no tratamento com DN, verificou destruição, fragmentação e lise de algumas miofibrilas. Para o autor, a descontinuidade do tratamento com DN, não promoveu melhorias na arquitetura do músculo cardíaco.

Por outro lado, Soliman et al.¹²¹ observaram que algumas miofibrilas restauraram sua aparência normal após duas semanas de descontinuidade do tratamento com DN, porém a maioria das miofibrilas mantiveram-se degeneradas.

A microscopia eletrônica de transmissão ainda revelou, nos animais que receberam DN, linhas Z curvadas, rompidas ou destruídas além do mais um estreitamento das linhas Z no grupo DN^B também foi demonstrado. Nessa direção, o estreitamento da linha Z pode estar relacionado com a destruição total de uma linha Z observada no sarcômero de um animal do grupo DN^B (Imagem 22, D). Vários relatos de espessamento na linha Z já foram descritos em usuários de EAA^{118,122,124}, porém este foi o primeiro estudo a descrever um estreitamento na linha Z que foi observado após a descontinuidade do tratamento com DN.

Após a descontinuidade do experimento, evidências apontam para uma reorganização da matriz extracelular no miocárdio, que provocou alterações no padrão e na distribuição das fibras de colágeno do miocárdio nos diferentes grupos.

Neste enfoque o estudo de Soliman et al.¹²¹ demonstrou, após quatro semanas de tratamento com DN, uma quantidade significativa de fibras colágenas no miocárdio de ratos dispostas ao redor dos vasos sanguíneos e no endomísio. No entanto, após duas semanas de descontinuidade no tratamento, uma quantidade moderada de fibras colágenas permaneceu ao entorno do endomísio. Deste modo, os resultados encontrados por Soliman et al.¹²¹ sugerem a reversibilidade parcial dos efeitos do DN no miocárdio de ratos.

Segundo estudo desenvolvido pôr Abdelhafez et al.¹²⁰, três meses de tratamento com DN ocasionou um aumento na quantidade de fibras colágenas no coração, e muitos cardiomiócitos foram substituídos por feixes de fibras de colágeno. Após trinta dias de interrupção no tratamento, foi evidenciado que muitos cardiomiócitos hipertrofiados foram totalmente substituídos por fibras de colágeno. Desta forma os resultados encontrados no estudo de Abdelhafez et al.¹²⁰, indicam não haver reversibilidade na quantidade de fibras colágenas no coração após a descontinuidade do tratamento com DN.

Um remodelamento da matriz extracelular pode ocorrer em resposta a estímulos mecânicos ou hormonais que são ativados após sobrecarga de pressão ou volume no miocárdio¹⁰², na tentativa de retornar o estresse tecidual ao seu valor normal⁹⁷. O colágeno intersticial do miocárdio não é uma proteína estática, e mudanças no equilíbrio

entre a síntese e a degradação podem levar a alterações na composição da rede de colágeno no coração¹⁶⁹.

Após doze semanas de descontinuidade, verificou-se que o epicárdio dos animais de todos os grupos é composto predominantemente por fibras de colágeno do tipo I, sendo a sua espessura maior nos animais tratados com DN, quando comparados aos grupos CO^B e TR^B. Esses dados contrastam com aqueles observados nos animais tratados com DN no subgrupo^A, que exibiram um epicárdio delgado, permitindo inferir a ocorrência de um remodelamento do colágeno nessa estrutura, com a descontinuidade do tratamento. No miocárdio detectou-se o predomínio das fibras colágenas do tipo I nos animais dos grupos CO^B no grupo TRDN^B as fibras do tipo I apresentaram-se delgadas, todavia quando se compara a densidades dessas fibras entre os grupos, verifica-se que a menor densidade ocorreu no grupo TRDN^B. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Weber et al.¹⁷⁰ ao demonstrarem que a maioria das fibras colágenas do endomísio e do perimísio é composta por fibras colágenas espessas do tipo I.

Por outro lado, o que se nota no miocárdio dos animais dos grupos TR^B e DN^B é um predomínio de fibras colágeno do tipo III. Ao se comparar principalmente os grupos DN, verificou-se que a descontinuidade do tratamento contribuiu para o remodelamento do colágeno no miocárdio, uma vez que no grupo DN^A o predomínio foi de fibras colágenas do tipo I.

Convém destacar, que o colágeno é um material relativamente rígido, com alta resistência à tração, deste modo pequenas mudanças em sua concentração podem exercer efeitos marcantes nas propriedades mecânicas passivas do coração⁹⁹. Além da concentração de colágeno, o comportamento passivo do miocárdio também pode ser dependente dos tipos de colágeno que compõem o miocárdio e suas relativas proporções, o diâmetro das fibras de colágeno e seu alinhamento espacial, e o grau de reticulação também influenciam⁹⁷. Assim, um tecido contendo predominantemente fibras colágenas do tipo I, de grande diâmetro e alto grau de reticulação será mais rígido do que um tecido composto por concentrações maiores de fibras colágenas do tipo III, com diâmetro relativamente pequeno e essencialmente sem colágeno reticulado¹¹¹.

Assim, tendo em vista a alta resistência à tração do colágeno fibrilar e sua íntima associação com os componentes funcionais do miocárdio, espera-se que o colágeno intersticial influencie o tamanho e a forma das câmaras cardíacas, assim como a função ventricular sistólica e diastólica. Portanto, não é surpreendente descobrir que

modificações anormais da matriz de colágeno alteram as propriedades mecânicas miocárdicas e a função ventricular¹⁵⁸.

No presente trabalho, o estudo ecocardiográfico não demonstrou alterações no volume do ventrículo esquerdo bem como não foi observado alterações na função sistólica e diastólica dos animais. Portanto o remodelamento observado na matriz extracelular do miocárdio, que provocou alterações no padrão e na distribuição das fibras de colágeno, não levou a perdas na função cardíaca.

Resultados similares aos encontrados no presente trabalho, foram obtidos por Hartgens et al.⁶⁸, no estudo a administração de EAA durante 16 semanas não levou a alterações ecocardiográficas detectáveis da morfologia do coração e na função sistólica e diastólica em atletas de TR. Palatini et al.¹⁷¹ também observaram função sistólica e diastólica preservada em levantadores de peso, usuários de EAA.

Em contraposição, relatos de prejuízos na função diastólica em decorrência da utilização de EAA também já foram demonstrados. Urhausen et al.¹⁷² relataram que o tratamento com EAA em fisiculturistas induziu a um aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo, e De Piccoli et al.⁶⁶ mostraram que o abuso de EAA está associado a hipertrofia patológica e enchimento diastólico alterado.

A este respeito Tanno et al.⁷² demonstraram que o tratamento com DN, associado ou não ao TR, induziu a um aumento do conteúdo de colágeno no miocárdio e, conseqüentemente, hipertrofia ventricular esquerda patológica, evidenciada pela diminuição do débito cardíaco, e pelo aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico. Assim, a disfunção sistólica e diastólica observada por Tanno et al.⁷² está relacionada ao remodelamento estrutural do miocárdio e, particularmente, ao desenvolvimento de fibrose miocárdica.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos, metodologias empregadas e resultados obtidos, é lícito concluir-se que:

1. O tratamento de 16 semanas, com altas doses de DN, promoveu hipertrofia cardíaca provocada pelo aumento na espessura dos cardiomiócitos. A hipertrofia cardíaca foi potencializada pela associação do DN ao TR.
2. A hipertrofia cardíaca decorrente da utilização do DN foi caracterizada como patológica, visto que foi encontrado alterações a nível ultraestrutural nas mitocôndrias e nas estruturas do sarcômeros.
3. Com a utilização de DN e TR ocorreu o remodelamento na matriz extracelular do miocárdio, que alterou o padrão e a distribuição dos tipos de fibras colágenas.
4. Após 12 semanas de interrupção do tratamento, os grupos que utilizaram DN e TR exibiram hipertrofia cardíaca, caracterizada pelo aumento na espessura dos cardiomiócitos. A associação do DN ao TR potencializou a hipertrofia cardíaca.
5. A hipertrofia cardíaca após a descontinuidade do tratamento com DN pode ser caracterizada como patológica, visto que foram encontradas alterações ultraestruturais nas mitocôndrias e nas estruturas do sarcômeros. Em contrapartida, no grupo que utilizou somente TR a hipertrofia cardíaca foi caracterizada como fisiológica.
6. Qualitativamente, a descontinuidade do tratamento com DN e TR promoveu o remodelamento na matriz extracelular do miocárdio, representada pela distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III.
7. O uso de DN está associado a diferentes efeitos deletérios sobre o miocárdio, alguns aparentemente não reversíveis após 12 semanas de descontinuidade no tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kannel WB. Left ventricular hypertrophy as a risk factor: the Framingham experience. *J Hypertens*. 1991;9(2):S3-8; discussion S8-9.
2. Levy D. Clinical significance of left ventricular hypertrophy: insights from the Framingham Study. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17 Suppl 2:S1-6.
3. Richey PA, Brown SP. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci*. 1998;16(2):129-41.
4. Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, de Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res*. 2007;5(2):114-20.
5. Urhausen A, Albers T, Kindermann W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart Br Card Soc*. 2004;90(5):496-501.
6. Rocha FL, Carmo EC, Roque FR, Hashimoto NY, Rossoni LV, Frimm C, et al. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3575-3583.
7. Andrade TU, Santos MCS, Busato VCW, Medeiros ARS, Abreu GR, Moysés MR, et al. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. *Arch Med Res*. 2008;39(1):27-32.
8. Carmo EC do, Rosa KT, Koike DC, Fernandes T, Silva Junior ND da, Mattos KC, et al. A associação de esteroide anabolizante ao treinamento físico aeróbio leva a alterações morfológicas cardíacas e perda de função ventricular em ratos. *Rev Bras Med Esporte*. 2011;17(2):137-41.
9. Kuhn CM. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:411-34.
10. Grace F, Sculthorpe N, Baker J, Davies B. Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS). *J Sci Med Sport*. 2003;6(3):307-12.
11. 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.
12. Winett RA, Carpinelli RN. Potential health-related benefits of resistance training. *Prev Med*. 2001;33(5):503-13.
13. Graves JE, Franklin BA. *Treinamento Resistido na Saúde e Reabilitação*. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2006.

14. Nelson ME, Fiatarone MA, Morganti CM, Trice I, Greenberg RA, Evans WJ. Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. *JAMA*. 1994;272(24):1909–14.
15. American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30(6):975–91.
16. Hurley BF, Roth SM. Strength training in the elderly: effects on risk factors for age-related diseases. *Sports Med*. 2000;30(4):249–68.
17. Roth SM, Ferrell RF, Hurley BF. Strength training for the prevention and treatment of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*. 2000;4(3):143–55.
18. Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, Chaitman BL, Fleg JL, Fletcher B, et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. *Circulation*. 2000;101(7):828–33.
19. American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(2):265–74.
20. Feigenbaum MS. Base Racional e Revisão das Diretrizes Anuais. In: *Treinamento Resistido na Saúde e Reabilitação*. Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2006. p. 13–32.
21. Nieman DC. *Exercício e Saúde*. São Paulo: Manole; 1999.
22. Hurley BF, Seals DR, Ehsani AA, Cartier LJ, Dalsky GP, Hagberg JM, et al. Effects of high-intensity strength training on cardiovascular function. *Med Sci Sports Exerc*. 1984;16(5):483–8.
23. Hickson RC, Dvorak BA, Gorostiaga EM, Kurowski TT, Foster C. Potential for strength and endurance training to amplify endurance performance. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1988;65(5):2285–90.
24. Gettman LR, Ayres JJ, Pollock ML, Jackson A. The effect of circuit weight training on strength, cardiorespiratory function, and body composition of adult men. *Med Sci Sports*. 1978;10(3):171–6.
25. Hickson RC, Rosenkoetter MA, Brown MM. Strength training effects on aerobic power and short-term endurance. *Med Sci Sports Exerc*. 1980;12(5):336–9.
26. Gettman LR, Ward P, Hagan RD. A comparison of combined running and weight training with circuit weight training. *Med Sci Sports Exerc*. 1982;14(3):229–34.

27. Verrill DE, Ribisl PM. Resistive exercise training in cardiac rehabilitation. An update. *Sports Med Auckl*. 1996;21(5):347–83.
28. MacDougall JD, Tuxen D, Sale DG, Moroz JR, Sutton JR. Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise. *J Appl Physiol*. 1985;58(3):785–90.
29. Fleck SJ, Dean LS. Resistance-training experience and the pressor response during resistance exercise. *J Appl Physiol*. 1987;63(1):116–20.
30. Fleck SJ. Cardiovascular adaptations to resistance training. *Med Sci Sports Exerc*. 1988;20(5 Suppl):S146-151.
31. McCartney N. Segurança do Treinamento Resistido – Fatores Hemodinâmicos e Incidentes Cardiovasculares. In: *Treinamento Resistido na Saúde e Reabilitação*. 1º ed Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2006. p. 83–93.
32. McKelvie RS, McCartney N, Tomlinson C, Bauer R, MacDougall JD. Comparison of hemodynamic responses to cycling and resistance exercise in congestive heart failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1995;76(12):977–9.
33. Meyer K, Hajric R, Westbrook S, Haag-Wildi S, Holtkamp R, Leyk D, et al. Hemodynamic responses during leg press exercise in patients with chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1999;83(11):1537–43.
34. Oliver D, Pflugfelder PW, McCartney N, McKelvie RS, Suskin N, Kostuk WJ. Acute cardiovascular responses to leg-press resistance exercise in heart transplant recipients. *Int J Cardiol*. 2001;81(1):61–74.
35. Barauna VG. *Participação do sistema renina angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento resistido* [Dissertação] São Paulo: Escola de Educação Física e Espore, Universidade de São Paulo; 2006.
36. Halbert JA, Silagy CA, Finucane P, Withers RT, Hamdorf PA, Andrews GR. The effectiveness of exercise training in lowering blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials of 4 weeks or longer. *J Hum Hypertens*. 1997;11(10):641–9.
37. Kelley GA, Kelley KS. Progressive resistance exercise and resting blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertens*. 2000;35(3):838–43.
38. Pinter R de CCE, Padilha AS, de Oliveira EM, Vassallo DV, de Fúcio Lizardo JH. Cardiovascular adaptive responses in rats submitted to moderate resistance training. *Eur J Appl Physiol*. 2008;103(5):605–13.
39. Barauna VG, Batista ML, Junior MLB, Costa Rosa LFBP, Casarini DE, Krieger JE, et al. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(4):249–54.

40. Perrault H, Turcotte RA. Exercise-induced cardiac hypertrophy. Fact or fallacy? *Sports Med.* 1994;17(5):288–308.
41. Pelliccia A, Maron BJ. Outer limits of the athlete's heart, the effect of gender, and relevance to the differential diagnosis with primary cardiac diseases. *Cardiol Clin.* 1997;15(3):381–96.
42. Fernandes T, Soci UPR, Oliveira EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz J Med.* 2011;44(9):836–47.
43. Dorn GW. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertens.* 2007;49(5):962–70.
44. Fagard R. Athlete's heart. *Heart.* 2003;89(12):1455–61.
45. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000;101(3):336–44.
46. Effron MB. Effects of resistive training on left ventricular function. *Med Sci Sports Exerc.* 1989;21(6):694–7.
47. Shapiro LM, Gibson DG. Patterns of diastolic dysfunction in left ventricular hypertrophy. *Br Heart J.* 1988;59(4):438–45.
48. Hildick-Smith DJ, Shapiro LM. Echocardiographic differentiation of pathological and physiological left ventricular hypertrophy. *Heart.* 2001;85(6):615–9.
49. Lise MLZ, Gama e Silva TS da, Ferigolo M, Barros HMT. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Rev Assoc Médica Bras.* 1999;45(4):364–70.
50. Silva PRP da, Danielski R, Czepielewski MA. Anabolic steroids in sports. *Rev Bras Med Esporte.* 2002;8(6):235–43.
51. Haupt HA, Rovere GD. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am J Sports Med.* 1984;12(6):469–84.
52. Celotti F, Negri Cesi P. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;43(5):469–77.
53. Creutzberg EC, Wouters EFM, Mostert R, Pluymers RJ, Schols AMWJ. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Chest.* 2003;124(5):1733–42.
54. Rocha FL, Roque FR, Oliveira EM de. Esteróides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. *Mundo Saúde.* 2007;31(4):470–7.
55. Camargo MD. Esteróides anabolizantes no esporte: uma revisão. *Semina Ciênc Biológicas e Saúde.* 1995;16(2):340–8.

56. Creutzberg EC, Schols AM. Anabolic steroids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999;2(3):243–53.
57. Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med*. 2004;32(2):534–42.
58. Do Carmo EC, Fernandes T, Koike D, Da Silva ND, Mattos KC, Rosa KT, et al. Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(10):1836–48.
59. Kennedy MC, Lawrence C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust*. 1993;158(5):346–8.
60. Melchert RB, Welder AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(9):1252–62.
61. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998;41(1):1–15.
62. Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci Reattelli L, Turillazzi E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(2):253–5.
63. Montisci M, El Mazloum R, Cecchetto G, Terranova C, Ferrara SD, Thiene G, et al. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: morphological and toxicological findings in four fatal cases. *Forensic Sci Int*. 2012;217(1–3):e13–18.
64. Krieg A, Scharhag J, Albers T, Kindermann W, Urhausen A. Cardiac tissue Doppler in steroid users. *Int J Sports Med*. 2007;28(8):638–43.
65. Pearson AC, Schiff M, Mrosek D, Labovitz AJ, Williams GA. Left ventricular diastolic function in weight lifters. *Am J Cardiol*. 1986;58(13):1254–9.
66. De Piccoli B, Giada F, Benettin A, Sartori F, Piccolo E. Anabolic steroid use in body builders: an echocardiographic study of left ventricle morphology and function. *Int J Sports Med*. 1991;12(4):408–12.
67. Karila T a. M, Karjalainen JE, Mäntysaari MJ, Viitasalo MT, Seppälä TA. Anabolic androgenic steroids produce dose-dependant increase in left ventricular mass in power athletes, and this effect is potentiated by concomitant use of growth hormone. *Int J Sports Med*. 2003;24(5):337–43.
68. Hartgens F, Cheriex EC, Kuipers H. Prospective echocardiographic assessment of androgenic-anabolic steroids effects on cardiac structure and function in strength athletes. *Int J Sports Med*. 2003;24(5):344–51.
69. Carmo EC do, Fernandes T, Oliveira EM de. Esteróides anabolizantes: do atleta ao cardiopata. *Rev Educ Física UEM*. 2012;23(2):307–18.

70. 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.
71. Soares MCR, Abreu IC de, Assenço F, Borges MO da R. Nandrolone decanoate increases the left ventricular wall but attenuates the cavity increase caused by swimming training in rats. *Rev Bras Med Esporte*. 2011;17(6):420–4.
72. Tanno AP, das Neves VJ, Rosa KT, Cunha TS, Giordano FCL, Calil CM, et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci*. 2011;89(17–18):631–7.
73. Brasileiro Filho G. *Bogliolo patologia*. 9^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
74. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470–9.
75. Garcia JAD, Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):443–50.
76. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1276–83.
77. Franchini KG. Biologia molecular. Mecanismos moleculares na hipertrofia cardíaca Estímulos hipertróficos. *Hipertensão*. 2002;5(4):112–7.
78. Franchini KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):125–42.
79. Lovic D, Narayan P, Pittaras A, Faselis C, Doumas M, Kokkinos P. Left ventricular hypertrophy in athletes and hypertensive patients. *J Clin Hypertens*. 2017;19(4):413–7.
80. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças*. 8^o ed. Rio de Janeiro: elsevier; 2010.
81. Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8(1):63–75.
82. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990;322(22):1561–6.
83. Barker WH, Mullooly JP, Getchell W. Changing incidence and survival for heart failure in a well-defined older population, 1970-1974 and 1990-1994. *Circulation*. 2006;113(6):799–805.
84. Fagard RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin*. 1997;15(3):397–412.

85. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;97:245–62.
86. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(4):255–62.
87. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569–82.
88. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell.* 2001;104(4):557–67.
89. Weeks KL, McMullen JR. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiol.* 2011;26(2):97–105.
90. Muhl C, Dassen WRM, Kuipers H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth Heart J.* 2008;16(4):129–33.
91. Morales C, Hita A, Gelpi RJ. Fisiología integrada de la hipertrofia cardíaca. *Rev Argent Cardiol.* 1999;67(3):377–88.
92. Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med.* 1975;82(4):521–4.
93. Schairer JR, Stein PD, Keteyian S, Fedel F, Ehrman J, Alam M, et al. Left ventricular response to submaximal exercise in endurance-trained athletes and sedentary adults. *Am J Cardiol.* 1992;70(9):930–3.
94. Carbone A, D'Andrea A, Riegler L, Scarafio R, Pezzullo E, Martone F, et al. Cardiac damage in athlete's heart: When the "supernormal" heart fails! *World J Cardiol.* 2017;9(6):470–80.
95. Kasikcioglu E, Oflaz H, Akhan H, Kayserilioglu A, Mercanoglu F, Umman B, et al. Left ventricular remodeling and aortic distensibility in elite power athletes. *Heart Vessels.* 2004;19(4):183–8.
96. Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* 2011;2(2):158–73.
97. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30:604–10.
98. Takala TES, Rämö P, Kiviluoma kai, Vihko V, Kainulainen H, Kettunen R. Effects of training and anabolic steroids on collagen synthesis in dog heart. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991;62:1–6.

99. Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM. Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration. *Circ Res*. 1988;63(3):577–92.
100. Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, et al. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):H122-132.
101. Souza RR. . Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*. 2002;3:325–335.
102. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*. 1993;129(2):101–20.
103. Medugorac I, Jacob R: Characterization of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovasc Res*. 1983;17:15-21
104. Eghbali M, Weber K. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem*. 1990;96(1):1-14.
105. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13(7):1637–52.
106. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:549–574.
107. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia básica: texto e atlas*. 13^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
108. Caulfield J, Borg T. The collagen network of the heart. *Lab Invest*. 1979;40:364–72.
109. Robinson T, Cohen-Gould L, Factor S. Skeletal framework of mammalian heart muscle. *Lab Invest*. 1983;49:482–98.
110. Robinson TF, Cohen-Gould L, Factor SM, Eghbali M, Blumenfeld OO. Structure and function of connective tissue in cardiac muscle: collagen types I and III in endomysial struts and pericellular fibers. *Scanning Microsc*. 1988;2(2):1005–15.
111. Pearlman E, Weber K, Janicki J, Pietra G, Fishman A. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest*. 1982;2:158–64.
112. Tortora G. *Princípios de anatomia humana*. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
113. Ross M, Pawlina W. *Histologia: texto e atlas*. 7^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
114. Martini F, Ober W, Bartholomew E, Nath J. *Anatomia e fisiologia humana*. Vol. 1. São Paulo: Person Education do Brasil; 2014.

115. Abrahamsohn P. *Histologia*. 1^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016
116. Brelje T, Sorenson R. *Histology Guide: virtual histology laboratory* [Internet]. 2019 [citado 22 de janeiro de 2019]. Disponível em: <http://www.histologyguide.com/index.html>
117. Behrendt H. Effect of anabolic steroids on rat heart muscle cells. I. Intermediate filaments. *Cell Tissue Res*. 1977;180(3):303–15.
118. Hassan NA, Salem MF, Sayed M a. EL. Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28(5):273–83.
119. Papamitsou T, Barlagiannis D, Papaliagkas V, Kotanidou E, Dermentzopoulou-Theodoridou M. Testosterone-induced hypertrophy, fibrosis and apoptosis of cardiac cells – an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2011;17(9):266–73.
120. Abdelhafez HM. Histological, histochemical and ultrastructural studies on the effect of deca-durabolin and whey protein isolate on cardiac muscle in adult male albino rats. *Int J Adv Res*. 2014;2(10):164–87.
121. Soliman ME-S, El-saify GH, Khair NSB, Soliman MAM, AboHabsa SS. Effect of Nandrolone on Rat Cardiac Muscle and the Possible Protective Role of Vitamin E : A Light & Electron Microscopic Study. *J Am Sci*. 2017;13(4):24–36.
122. Elgendy HA-E, Alhawary AA-E, El-Shahat MA-E, Ali AT. Effect of Anabolic Steroids on the Cardiac and Skeletal Muscles of Adult Male Rats. *Int J Clin Dev Anat*. 2018;4(1):1-14.
123. Mahmoud AA, Mekawy NH, Mohammed MZmZ. The Nandrolone Effect on Cardiac Muscle of Adult Male Albino Rat and the Possible Role of Nigella sativa: Light and Electron Microscopic Studies. *J Biochem Cell Biol*. 2018;1(2):1-7.
124. Behrendt H, Boffin H. Myocardial cell lesions caused by an anabolic hormone. *Cell Tissue Res*. 1977;181(3):423–6.
125. Hatt PY, Berjal G, Moravec J, Swynghedauw B. Heart failure: an electron microscopic study of the left ventricular papillary muscle in aortic insufficiency in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol*. 1970;1(3):235–47.
126. Appell HJ, Heller-Umpfenbach B, Feraudi M, Weicker H. Ultrastructural and morphometric investigations on the effects of training and administration of anabolic steroids on the myocardium of guinea pigs. *Int J Sports Med*. 1983;4(4):268–74.
127. Trifunovic B, Norton GR, Duffield MJ, Avraam P, Woodiwiss AJ. An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. *Am J Physiol*. 1995;268(3 Pt 2):H1096-1105.

128. Woodiwiss AJ, Trifunovic B, Philippides M, Norton GR. Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. *J Appl Physiol*. 2000;88(2):409–15.
129. Pope HG, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry*. 1988;145(4):487–90.
130. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol*. 1998;77(4):372–8.
131. Hornberger TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appl*. 2004;29(1):16–31.
132. Nascimento V, Krause Neto W, Gonçalves L, Maifrino LBM, Souza RR, Gama EF. Morphoquantitative analysis revealed Triceps Brachialis muscle hypertrophy by specific Resistance training equipment in rats. *J Morphol Sci*. 2013;30(4):276–80.
133. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072–83.
134. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447–55.
135. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987;147(Pt 3):229–63.
136. Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(2):65–82.
137. Weibel E. *Stereological methods. Practical methods for biological morphometry*. Vol. 1. New York: Academic Press; 1979.
138. Weibel E. *Stereological methods. Theoretical foundations*. Vol. 2. New York: Academic Press; 1980.
139. Watson ML. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. *J Biophys Biochem Cytol*. 1958;4(4):475–8.
140. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963;17:208–12.
141. Pereira-Junior PP, Chaves EA, Costa-E-Sousa RH, Masuda MO, de Carvalho ACC, Nascimento JHM. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol*. 2006;96(5):487–94.

142. Gonçalves L, de Souza RR, Maifrino LBM, Caperuto ÉC, Carbone PO, Rodrigues B, et al. Resistance exercise and testosterone treatment alters the proportion of numerical density of capillaries of the left ventricle of aging Wistar rats. *Aging Male*. 2014;17(4):243–7.
143. Bissoli NS, Medeiros ARS, Santos MCS, Busato VCW, Jarske RD, Abreu GR, et al. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. *Pharmacol Res*. 2009;59(6):379–84.
144. Franquni JVM, do Nascimento AM, de Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Cassaro KODS, et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids*. 2013;78(3):379–85.
145. Yu-Yahiro JA, Michael RH, Nasrallah DV, Schofield B. Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. *Am J Sports Med*. 1989;17(5):686–9.
146. Hassan AF, Kamal MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int J Health Sci*. 2013;7(1):47–60.
147. Schroeder ET, Zheng L, Yarasheski KE, Qian D, Stewart Y, Flores C, et al. Treatment with oxandrolone and the durability of effects in older men. *J Appl Physiol*. 2004;96(3):1055–62.
148. Devereux RB, Drayer JI, Chien S, Pickering TG, Letcher RL, DeYoung JL, et al. Whole blood viscosity as a determinant of cardiac hypertrophy in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1984;54(6):592–5.
149. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OH. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol*. 1991;260(1 Pt 2):H136-145.
150. Haykowsky MJ, Dressendorfer R, Taylor D, Mandic S, Humen D. Resistance Training and Cardiac Hypertrophy: Unravelling the Training Effect. *Sports Med*. 2002;32(13):837–49.
151. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol*. 2001;281(6):R2029–36.
152. Dickerman RD, Schaller F, Zachariah NY, McConathy WJ. Left ventricular size and function in elite bodybuilders using anabolic steroids. *Clin J Sport Med*. 1997;7(2):90–3.
153. Boon J. *Manual of Veterinary Echocardiography*. 1^o ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1998. 448 p.

154. Nottin S, Nguyen L-D, 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.
155. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83(6):1849–65.
156. Nieminen MS, Rämö MP, Viitasalo M, Heikkilä P, Karjalainen J, Mäntysaari M, et al. Serious cardiovascular side effects of large doses of anabolic steroids in weight lifters. *Eur Heart J*. 1996;17(10):1576–83.
157. Trifunovic B, Woodiwiss AJ, Duffield M, Norton GR. Novel attributes of an androgenic steroid-mediated increase in cardiac end diastolic stiffness in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76(6):657–64.
158. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail*. 2002;8(6 Suppl):S319–325.
159. Schaper J, Thiedemann KU, Flameng W, Schaper W. The ultrastructure of sarcomeres in hypertrophied canine myocardium in spontaneous subaortic stenosis. *Basic Res Cardiol*. 1974;69(5):509–15.
160. Bishop SP, Cole CR. Ultrastructural changes in the canine myocardium with right ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1969;20(3):219–29.
161. Legato MJ. Ultrastructural characteristics of the rat ventricular cell grown in tissue culture, with special reference to sarcomerogenesis. *J Mol Cell Cardiol*. 1972;4(4):299–317.
162. Baines CP. The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:61–80.
163. O'Mahoney ME, Logue S, Szegezdi E, Stenson-Cox C, Fitzgerald U, Samali A. Hypoxia and ischemia induce nuclear condensation and caspase activation in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:728–32.
164. Lemmer JT, Ivey FM, Ryan AS, Martel GF, Hurlbut DE, Metter JE, et al. Effect of strength training on resting metabolic rate and physical activity: age and gender comparisons. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(4):532–41.
165. Kahal A, Allem R. Reversible effects of anabolic steroid abuse on cyto-architectures of the heart, kidneys and testis in adult male mice. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:917–22.
166. Lusetti M, Licata M, Silingardi E, Reggiani Bonetti L, Palmiere C. Pathological changes in anabolic androgenic steroid users. *J Forensic Leg Med*. 2015;33:101–4.
167. Kinson GA, Layberry RA, Hébert B. Influences of anabolic androgens on cardiac growth and metabolism in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69(11):1698–704.

168. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98(3):256–61.
169. Bishop JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl C:38–44.
170. Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. Patterns of myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;21 Suppl 5:121–31.
171. Palatini P, Giada F, Garavelli G, Sinisi F, Mario L, Michieletto M, et al. Cardiovascular effects of anabolic steroids in weight-trained subjects. *J Clin Pharmacol*. 1996;36(12):1132–40.
172. Urhausen A, Hölpes R, Kindermann W. One- and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. *Eur J Appl Physiol*. 1989;58(6):633–40.