



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

LILIAN BARBOSA PEREIRA

Efeito do estanozolol sobre o aparelho reprodutor em ratos Wistar

Recife – 2014

LILIAN BARBOSA PEREIRA

Efeito do estanozolol sobre o aparelho reprodutor em ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Recife - 2014

LILIAN BARBOSA PEREIRA

“EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE O APARELHO REPRODUTOR EM RATOS WISTAR”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Carlos Alves - CPqAM/FIOCRUZ

Se Deus encheu minha vida de obstáculos, é porque Ele acredita na minha capacidade de passar por cada um deles, pois está escrito: Não veio sobre vós tentação, senão humana; mas fiel é Deus, que não vos deixará tentar acima do que podeis, antes com a tentação dará também o escape, para que a possais suportar.

1 Coríntios 10:13

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, agradeço a esse Deus tão maravilhoso, o qual me presenteou com o milagre da vida, por ter me carregado quando me faltaram forças, pela fidelidade, por não ter desistido de mim, pelo amor, pela oportunidade de conhecê-lo, servi-lo, e principalmente por ter sofrido por mim e me salvado, mesmo sem merecer. A ti Senhor dedico tudo o que tenho e o que sou.

A minha família pela dedicação e formação. Hoje posso afirmar que foram os ensinamentos, os conselhos e o amor dos meus pais que formaram meu caráter. Sou grata eternamente a Deus por tudo o que vocês representam para mim.

Ao meu namorado por ser simplesmente esse companheiro maravilhoso que Deus colocou em minha vida, para me ajudar a enxergar o meu verdadeiro propósito. Agradeço-te pelos ensinamentos, paciência e pelo teu amor.

Aos Professores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira, pela confiança em me conceder a oportunidade de estar realizando esta etapa tão importante da minha vida acadêmica e profissional.

Para a concretização deste trabalho foi essencial também o convívio com todos do Laboratório de Histologia que sempre nos ajudam em momentos difíceis, agradeço por terem me proporcionado momentos tão descontraídos. Gostaria de destacar entre estas pessoas: Franklin, Edna, Laíse, Sandra, Solange, Clóvis, Cibele, Hilda, Carolis, Cintiá, Cris, Marta, Raionir, Lécio e Thiago. Agradeço a todos pelos conhecimentos, experiências e momentos de alegria e de sufoco. Em especial a Ismaela, Welma, Rose, Carina e Ilka pela amizade, conselhos, apoio, ensinamentos e pela lealdade nos momentos em que mais precisei. Amo muito todos que fazem parte desta família.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE por ter cedido às instalações para a realização deste trabalho, em especial ao bioterista Marcos André por cuidar dos animais utilizados durante o experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) pela oportunidade.

Em fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

Nos últimos anos, observa-se que os esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são comumente associados aos critérios de perfeição corporal vigente na sociedade. O uso abusivo dos EAA vem fazendo parte da rotina de muitos jovens e praticantes de atividade física. Esse comportamento tem resultado em uma série de efeitos colaterais indesejáveis, principalmente relacionados à fisiologia do sistema reprodutor masculino. O estanozolol é um dos EAA mais utilizados indiscriminadamente, pois segundo os usuários ele é preferido por causar aumento de força sem ganho de peso em excesso e ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular, além de ser o EAA que apresenta a maior relação anabólico-androgênica (30:1). Apesar de muitos estudos sobre a relação do uso abusivo dos EAA com a infertilidade masculina, pouco se sabe sobre os efeitos do estanozolol no sistema reprodutor de ratos e a relação destes efeitos com patologias relacionadas a este sistema. Assim a presente pesquisa analisou os efeitos do estanozolol sobre os testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal de ratos através dos seguintes parâmetros: índices organossomáticos, histologia, processos de angiogênese, apoptose e proliferação celular. Para tanto, foram utilizados 21 ratos albinos, com 120 dias de idade e peso médio de 327g, divididos nos seguintes grupos: ratos sem tratamento (GI), ratos tratados com óleo de gergelim (GII) e ratos tratados com doses supra fisiológicas de estanozolol (5mg/Kg) diluído em óleo de gergelim (1 mL/kg), diariamente, 5 vezes por semana, por um período de 4 semanas consecutivas (GIII). Os resultados revelaram que houve uma redução significativa no peso dos órgãos e do índice organossomático nos animais tratados com estanozolol, além de alterações histológicas e imunohistoquímicas apenas nos testículos e próstata, caracterizadas pelo aumento do índice apoptótico, redução do índice de proliferação celular e imunomarcção mais intensa para a expressão do VEGF-A. Assim conclui-se que a administração diária de 5mg/Kg de estanozolol, cinco vezes por semana, no período de 4 semanas, pode levar a efeitos semelhantes a outros EAA os quais interferem no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal causando supressão hormonal (gonadotrofinas, testosterona, etc) e conseqüentemente redução ou atrofia dos órgãos hormônios-dependentes do aparelho reprodutor masculino.

Palavras-chave: anabolizantes, reprodução, apoptose, angiogênese, proliferação.

ABSTRACT

In recent years, it is observed that anabolic androgenic steroids (AAS) are commonly associated with the criteria in effect bodily perfection in society. The abuse of AAS has been part of the routine of many young and physically active. This behavior has resulted in a number of undesirable side effects, mainly related to the physiology of the male reproductive system. Stanozolol is one of the AAS most used indiscriminately, because according to users it is preferred because it increases the strength without excess weight gain and help in fat loss, preserving muscle mass besides being the AAS that presents the highest anabolic-androgenic ratio. Despite many studies about the relation of the abuse of AAS with male infertility, little is known about the effects of stanozolol in the reproductive system of rats and the relationship of these effects with this system related pathologies. Thus, the present study examined the effect of stanozolol on the testes, epididymis, prostate and seminal vesicle of rats by the following parameters: organosomatic indices, histology, processes of angiogenesis, apoptosis and cell proliferation. For this, 21 albino rats with 120 days of age and weighing 327g were used and divided into the following groups: rats without treatment (GI), rats treated with sesame oil (GII) and rats treated with stanozolol (5mg/kg) in sesame oil (1 mL / kg) daily, 5 times a week for a period of 4 consecutive weeks (GIII). The results revealed that there was a significant reduction in organ weights and organosomatic index in animals treated with stanozolol, as well as histological and immunohistochemical changes only in the testes and prostate, characterized by increased apoptotic index, decreased cell proliferation and immunostaining more intense for the expression of VEGF-A. Thus it is concluded that daily administration of 5mg/kg stanozolol, five times a week, 4 weeks, can lead to similar to other AAS effects which interfere with the hypothalamic-pituitary-gonadal causing hormone suppression (gonadotropins, testosterone, etc.) and consequently decrease or atrophy of hormone-dependent organs of the male reproductive system.

Keywords: anabolic, reproduction, apoptosis, angiogenesis, proliferation.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- FIGURA 1.** Mecanismo de regulação da síntese e liberação de gonadotrofinas por retroalimentação negativa.....17
- FIGURA 2.** Mecanismo de biossíntese da testosterona a partir do colesterol.....18
- FIGURA 3:** Mecanismo de ação dos esteroides anabólico-androgênicos.....19
- FIGURA 4:** Possíveis formas de manipulação da molécula original de testosterona para formulação dos EAA..... 21
- FIGURA 5:** Mecanismo da apoptose.....27

CAPITULO II

- Figura 1:** Gráfico do Índice organossomático (IO) dos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$).....52
- Figura 2:** Fotomicrografia de cortes de Testículos dos animais dos grupos experimentais. A - Túbulos seminíferos (GI). Aumento 42X. B - Epitélio seminífero (GI). Aumento 428X. C - Túbulo seminífero (GII). Aumento 42X. D e E - Túbulo seminífero (GII). Aumento 107X. F - Detalhe epitélio seminífero (GIII). Aumento 428X. Seta longa - tecido intersticial; Cabeça de seta - lâmina basal; Seta curta - Espermatozoides; TS - Túbulos seminíferos; EP - epitélio seminífero; *- Células de Sertoli; L - Lúmen. Coloração H.E.....53
- Figura 3:** Fotomicrografia de cortes dos epidídimos dos animais dos grupos experimentais. A - Ducto epididimário (GI). Aumento 107X. B - Detalhe do epitélio (GI). Aumento 428X. C - Epidídimo (GII). Aumento 107X. D - Epitélio do epidídimo (GII). Aumento 428X. E - Epidídimo (GIII). Aumento 107X. F - Detalhe do epitélio (GIII). Aumento 428X. Seta longa- tecido conjuntivo; Seta curta - Estereocílios;

Cabeça de seta- lâmina basal; DE - Ducto epididimário; ES - Espermatozoides; EP - Epitélio pseudo-estratificado colunar. Coloração H.E.....54

Figura 4: Fotomicrografia dos cortes de vesículas seminais dos animais dos grupos experimentais. A - Vesícula seminal (GI). Aumento 107X. B - Detalhe da mucosa (GI). Aumento 428X. C - Vesícula seminal (GII). Aumento 107X. D - Lâmina própria (GII). Aumento 428X. E - Vesícula seminal (GIII). Aumento 107X. F - Detalhe do epitélio e camada muscular (GIII). Aumento 428X. Seta longa - lâmina própria; Seta amarela: pregas da mucosa; Seta curta: prolongamentos do epitélio; LS - Líquido seminal; Barra amarela - Capa média muscular. Coloração H.E.....55

Figura 5: Fotomicrografia dos cortes da região periférica da próstata dos animais dos grupos experimentais. A - Próstata (GI). Aumento 42X. B - Detalhe das glândulas túbulo-alveolares (GI). Aumento 107X. C - Próstata (GII). Aumento 42X. D - Detalhe do epitélio glandular (GII). Aumento 107X. E - Glândulas túbulo-alveolares (GIII). Aumento 42X. F - Detalhe do epitélio glandular (GIII). Coloração H.E. Aumento 107X. Seta longa - Estroma; Seta curta - epitélio glandular; LP - Líquido prostático; * - Glândulas túbulo-alveolares. Coloração H.E.....56

Figura 6: Apoptose teste de TUNEL: Testículo (A) controle e (B) estanozolol. Próstata (C) controle e (D) estanozolol. Proliferação celular teste Ki-67: Testículo (E) controle e (F) estanozolol. Próstata (G) controle e (H) estanozolol. Barras = 100µm.....57

Figura 7: Gráfico do Índice apoptótico (IA) nos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (*P<0,05).....58

Figura 8: Gráfico do Índice de proliferação celular (IPC) nos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (*P<0,05).....58

Figura 9: Imunomarcagem com VEGF - A: Testículo (A) controle e (B) estanozolol. Próstata (C) controle e (D) estanozolol. Vesícula seminal (E) controle e (F) estanozolol. Epidídimo (G) controle e (H) estanozolol. Barras = 100µm.....59

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) do peso dos órgãos (g) dos animais dos grupos experimentais.....	52
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC-PKA - Monofosfato cíclico de adenosina-proteína quinase A

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Apaf-1 - proteína reguladora da apoptose

AR - Receptor androgênico

DHEA - Desidroepiandrosterona

DHEAS - Derivados sulfatados de deidroepiandrosterona

DHT - Dihidrotestosterona

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

EAA - Esteroide anabólico androgênico

EST - Estanozolol

FSH - Hormônio folículo estimulante

Flt-1 - Receptor 1 do fator endotelial vascular

Flk-1 - Receptor 2 do fator endotelial vascular

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

HCG - Gonadotrofina coriônica humana

hGH - hormônio de crescimento

HHG - hipotálamo-hipófise-gonadal

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IAP - inibidores da apoptose

LHRH - Hormônio de liberação luteinizante

LH - Hormônio luteinizante

LNCaP - linhagem de células cancerígenas da próstata de humanos

mRNA - RNA mensageiro

PGF - fator de crescimento placentário

RA - Receptor de andrógeno

RTK - receptores tirosina quinase

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR1 - receptores de VEGF 1

VEGFR2 - receptores de VEGF 2

TNF - fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

	Pág.
Preâmbulo	
Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas e Siglas	XI
Capítulos	
1	
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Hormônios esteroides.....	15
2.2. Andrógenos.....	15
2.3. Esteroides Anabólico-Androgênicos (EAA).....	19
2.4. Uso indiscriminado dos EAA.....	21
2.5. Estanozolol.....	24
2.6. EAA e o aparelho reprodutor masculino.....	24
2.7. Apoptose celular.....	26
2.8. Proliferação Celular.....	29
2.9. Angiogênese.....	30
3. REFERÊNCIAS	33
2	
Estudo histológico e imunohistoquímico do efeito do estanozolol sobre testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal de ratos.....	41
Resumo	41
1.Introdução	42
2.Material e métodos	44
3.Resultados	49
4.Discussão	60
5.Conclusão	63
Referências	64

Ficha Catalográfica

P436e Pereira, Lilian Barbosa
 Efeito do estanozolol sobre o aparelho reprodutor em ratos
Wistar / Lilian Barbosa Pereira. -- Recife, 2014.
 70 f.: il.

 Orientador (a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
 Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência
Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
 Referências.

 1. Anabolizantes 2. Reprodução 3. Apoptose
4. Angiogênese 5. Proliferação I. Teixeira, Álvaro Aguiar
Coelho, orientador II. Título

CDD 591.4

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólico-androgênicos (EAA) são um grupo de compostos naturais e sintéticos formados pela testosterona e seus derivados, os quais possuem tanto efeitos anabólicos quanto androgênicos. Assim, estimulam o crescimento muscular e a função do sistema reprodutor masculino através de suas propriedades farmacocinéticas, biodisponibilidade e balanço entre suas atividades androgênicas e anabólicas (MARQUES ; PEREIRA; AQUINO NETO, 2003; KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008).

Os efeitos androgênicos são responsáveis pelo desenvolvimento do trato reprodutivo masculino e das características sexuais secundárias, assim como pela manutenção da função reprodutiva. Os efeitos anabólicos se referem ao estímulo da fixação do nitrogênio, causando um balanço nitrogenado positivo, por aumentar a síntese proteica em diversos tecidos (SHAHIDI, 2001).

Nos últimos anos, principalmente entre os jovens, observa-se que os anabolizantes são comumente associados aos critérios de perfeição e boa performance física, vigentes na sociedade (IRIART; ANDRADE, 2002; LABRE, 2002). Contudo, com o objetivo de aumentar o processo anabólico celular, o crescimento muscular e a subsequente melhoria no desempenho físico em curtos intervalos de tempo, alguns praticantes tanto de exercícios físicos anaeróbios como aeróbios vêm fazendo uso indiscriminado de esteroides anabolizantes (KICMAN; GOWER, 2003).

O estanozolol (17 β -hidroxi-17-metil- 5 α -androstano [3,2-c] pirazol) é um éster da testosterona, utilizado na medicina no tratamento auxiliar de várias patologias, como na endometriose, no estímulo da eritropoiese em algumas anemias, na aceleração da cicatrização em grandes traumas ou cirurgias, na sarcopenia em pacientes com HIV e na terapia do hipogonadismo masculino (BEUTEL; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2005; FALANGA et al., 1998).

Esse anabolizante é preferido por muitas pessoas por causar aumento de força sem ganho de peso em excesso, promover aumento na vascularização, e não

se converter em estrógeno. Ele também não causa retenção de água em excesso, e mesmo às vezes parece ter um efeito diurético, além de ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular, embora isto não tenha sido provado cientificamente (WILLIAMSON; CONE; HUARD, 1995).

Os anabolizantes agem no hipotálamo e na hipófise para suprimir a produção de gonadotrofinas hipofisárias luteinizantes (LH) e folículo estimulante (FSH), causando uma diminuição na produção de testosterona natural nos testículos e também reduzindo ou cessando a produção de espermatozoides. Uma das funções do LH é aumentar a síntese de 3'-5'-monofosfato de adenosina (AMPcíclico) nas células intersticiais do testículo, o que aumenta a conversão de colesterol para estrógenos. O FSH promove a espermatogênese e aumenta a atividade da LH, aumentando a síntese de testosterona (WILSON, 1996).

Durante o uso dos esteroides anabolizantes, geralmente em períodos de seis a oito semanas, pode ocorrer acentuada diminuição ou atrofia do volume testicular, diminuição da fertilidade, produzindo um efeito deletério na secreção gonadotrófica, interferindo na espermatogênese, aumentando a libido e tendo uma diminuição da testosterona endógena (KOZIRIS, 2000; TELOKEN; BADALOTTI; PALKA, 2000). Além de provocar euforia, irritabilidade, comportamento agressivo, depressão, psicose, hipertrofia do ventrículo esquerdo do coração, ginecomastia, dor testicular, infertilidade, hipertrofia da próstata e anemia ferropriva (ARAÚJO, ANDREOLO; SILVA, 2002; FERRARI, 2011; RIBEIRO, 2001; SANTOS, 2003; SILVA; DANIELSKI; ZEPIELEWSKI, 2002). Esses efeitos não são sempre reversíveis, mesmo quando os andrógenos artificiais são suspensos. Cânceres da próstata são frequentemente dependentes da testosterona e eles podem progredir rapidamente na presença de alto nível de andrógenos (ARAÚJO, ANDREOLO; SILVA, 2002; RIBEIRO, 2001).

O estudo dos efeitos das substâncias que influenciam nos níveis de andrógenos, como por exemplo, o estanozolol, nos diferentes sistemas, principalmente no sistema reprodutor masculino é de grande interesse clínico. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da administração do estanozolol em ratos adultos sobre o aparelho reprodutor, através da análise dos índices organossomáticos e histologia dos testículos, epidídimo,

próstata e vesícula seminal, bem como os processos de angiogênese, apoptose e proliferação celular em tais órgãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hormônios Esteroides

Hormônio são substâncias químicas produzidas pelas glândulas endócrinas, secretadas em pequenas quantidades, na circulação sanguínea e que, transportada até células alvo, produz uma resposta fisiológica. Desempenham papel de grande importância no desenvolvimento dos organismos, pois controlam o crescimento, a reprodução e o metabolismo. Possuem diferentes estruturas químicas, podendo ser oriundos de proteínas (peptídeos), ou do colesterol (esteroides) (BOFF, 2010; CUNHA et al., 2004).

Os hormônios esteroides incluem os hormônios adrenocorticais, os metabólitos ativos da vitamina D e aqueles produzidos pelas gônadas (andrógenos). A definição biológica de um androgênio é qualquer substância que produz especificamente o crescimento das gônadas masculinas (BOFF, 2010; CUNHA et al., 2004).

Na espécie humana, existem quatro formas principais de andrógenos circulantes: a testosterona, diidrotestosterona (DHT), androstenediona, deidroepiandrosterona (DHEA). As ações da testosterona e dos andrógenos correlatos têm diferentes efeitos, anabólicos e ou androgênico, dependendo da necessidade do tecido alvo. No caso dos tecidos que compreendem o sistema reprodutor possuem efeito androgênico, estimulando eventos relacionados à função reprodutiva, como a espermatogênese e desenvolvendo caracteres sexuais secundários, por outro lado, os efeitos anabólicos estimulam o processo de síntese, atuando sobre diferentes tecidos como: muscular, ósseo e adiposo, e em diferentes órgãos como fígado e rins (CUNHA et al., 2004; DORNAS; NAGEM; OLIVEIRA, 2006; SHAHIDI, 2001).

2.2 Andrógenos

Embora a testosterona seja o mais importante e abundante andrógeno sintetizado principalmente nas células intersticiais e secretado a partir dos testículos, perfazendo 95% do total dos andrógenos circulantes, ela não é uma substância ativa, na circulação funciona como um pró-hormônio na formação de duas classes de esteroides: andrógenos 5 α -reduzidos (DHT), que são mediadores intracelulares da maioria das ações androgênicas; e estrógenos (estradiol), que potencializam alguns efeitos androgênicos, enquanto bloqueiam outros (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Os testículos secretam, também, só que em quantidades menores, o DHEA e o androstenediol, bem como quantidades muito pequenas de 5- α -diidrotestosterona. Dentre os esteroides androgênicos sintetizados pela supra-renal, podemos destacar a DHEA e a androstenediona. Todos esses androgênios são posteriormente convertidos em testosterona no fígado (HIORT, 2002; KICMAN, 2008; SINGH et al., 2009; WALKER, 2010; ZHU, 2005).

A síntese dos andrógenos depende da ação das gonadotrofinas, produzidas e armazenadas na hipófise anterior: os hormônios luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH). A liberação destes hormônios é mediada pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), sintetizado no hipotálamo (GARDINER; SHOBACK, 2013; GUYTON; HALL, 2006).

No homem, as células testiculares secretoras de testosterona são denominadas células de Leydig e são estimuladas pelo LH, que causa o aumento da produção do AMPcíclico, que induz o aumento da conversão de colesterol em androgênios. Desta forma, a quantidade de testosterona secretada aumenta aproximadamente em proporção direta à quantidade de LH disponível. A testosterona, secretada pelos testículos em resposta ao LH, exerce efeito recíproco de inibir diretamente a secreção de LH pela hipófise anterior. Porém, a maior parte dessa inibição resulta do efeito direto da testosterona sobre o hipotálamo, diminuindo a secreção do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Isso, por sua vez, causa diminuição correspondente da secreção de LH e de hormônio folículo-estimulante (FSH) pela hipófise anterior. Através deste efeito automático de retroalimentação negativa, operando através do hipotálamo e da hipófise anterior,

regula a secreção de testosterona para o nível desejado (GARDNER; SHOBECK, 2013; HIORT, 2002).

O FSH, secretado pela hipófise anterior, liga-se a receptores específicos nas células de Sertoli dos túbulos seminíferos. Essa ligação determina o crescimento das células de Sertoli, que passam a secretar várias substâncias espermatogênicas (testosterona e DHT), permitindo sua difusão das células de Leydig para o interior dos túbulos seminíferos, também exercem efeito trófico sobre a espermatogênese (Figura 1) (GARDNER; SHOBECK, 2013; GUYTON, HALL, 1997; HIORT, 2002).

Nos homens, o nível de testosterona é de 25 a 125 vezes maior nos testículos (340-2000 nM), quando comparados aos níveis séricos (8,7-35 nM) Resultados similares foram encontrados nos testículos de ratos (WALKER, 2010).

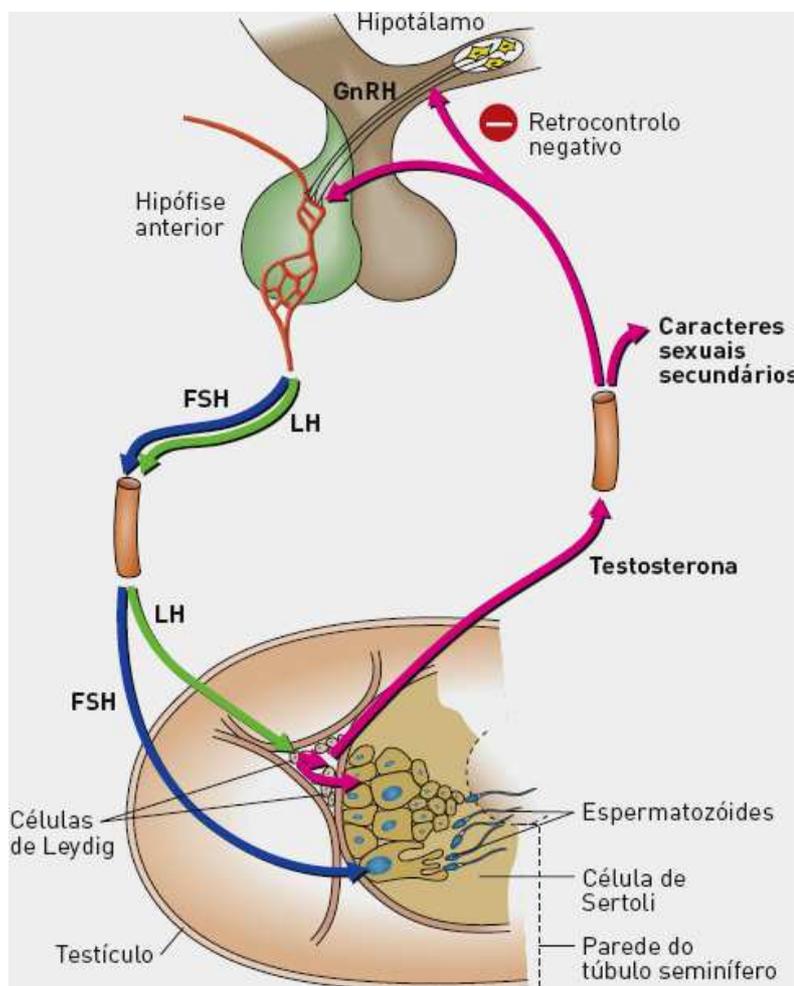


Figura 1. Mecanismo de regulação da síntese e liberação de gonadotrofinas por retroalimentação negativa (Disponível em: <http://forum.netxplica.com/>).

Outro importante hormônio na secreção da testosterona é a prolactina, que atua controlando a entrada do colesterol na mitocôndria onde ele será transformado em pregnenolona, o principal precursor dos hormônios esteroides. Esta por sua vez difunde-se ao citosol indo até o retículo endoplasmático liso, onde por ação de enzimas será convertida, subseqüentemente, em Δ -5 pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona, dihidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol e finalmente pela ação da enzima 17-hidroxiesteróide desidrogenase, em testosterona (Figura 2) (BOFF, 2010).

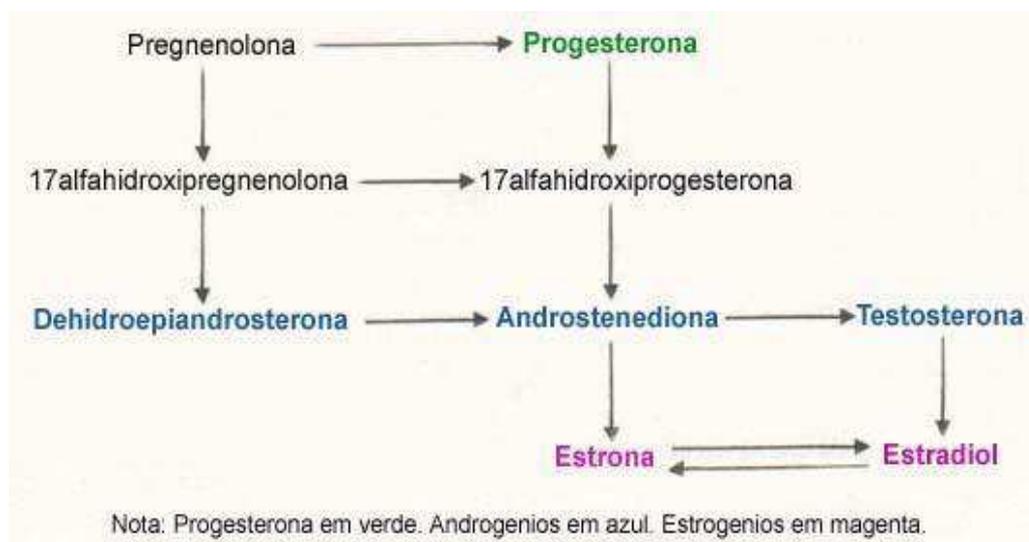


Figura 2. Mecanismo de biossíntese da testosterona a partir do colesterol (SOUKASAU, 1993).

Em muitos tecidos alvos de androgênios, como a próstata, a diidrotestosterona é mais ativa que a testosterona. Sabe-se que a diidrotestosterona liga-se ao receptor de andrógeno (RA) dez vezes mais fortemente que a testosterona, formando um complexo receptor muito estável. O efeito final dos andrógenos é a somatória das ações de testosterona, da diidrotestosterona e do estradiol (KICMAN, 2008; WILSON, 1996).

O receptor de andrógeno localiza-se no citoplasma das células responsivas aos andrógenos: células musculares, testiculares, queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos B. Os compostos que passam através das membranas celulares e ligam-se aos receptores de andrógenos com afinidades

diferentes, embora todos os receptores distribuídos ao longo do corpo possuem a mesma afinidade de ligação para um esteroide particular. O RA, membro da superfamília dos receptores nucleares, é codificado por um gene localizado no cromossomo Xq. Depois de se ligar ao receptor no tecido alvo, há a formação do complexo hormônio-receptor, este se desloca ao núcleo, onde se liga ao ácido desoxirribonucleico (DNA). Uma vez ligado ao DNA, o complexo receptor de esteroides inicia um processo que finalmente leva à síntese de proteínas e outras estruturas celulares (Figura 3). Acredita-se que esta afinidade do receptor intracelular específico em diferentes tecidos varia de acordo com alguns fatores, tais como a presença de enzimas diferentes (por exemplo, 5 α -redutase e aromatase) e presença de receptores, explicando parcialmente os vários efeitos produzidos por diferentes EAA (BAHRKE; YESALIS, 2004; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006; GAO et. al., 2005; GAO; BOHL; DALLON, 2007; HALL; HALL, 2005; PALVIMO, 2012; SATO et. al., 2003; TORALDO et al., 2012; ZHU, 2005).

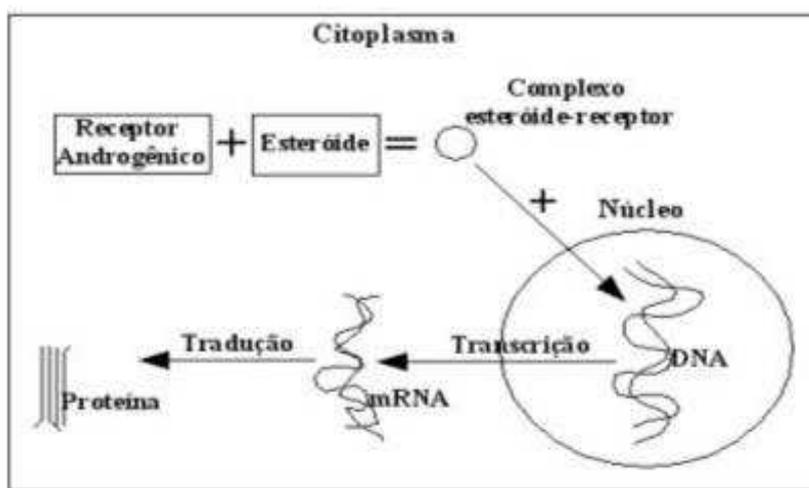


Figura 3. Mecanismo de ação dos esteroides anabólico-androgênicos (Fonte: <<http://www.treinomonster.com/>>).

2.3 Esteroides anabólico-androgênicos (EAA)

Esteroides anabólicos androgênicos são derivados sintéticos do hormônio testosterona e foram desenvolvidos com finalidades terapêuticas, sendo utilizados no tratamento de várias doenças. A utilização dos esteroides anabólicos na clínica

médica geralmente ocorre em situações onde o objetivo é o aumento da síntese proteica, sendo empregados no tratamento de hipogonadismo masculino, osteoporose, puberdade atrasada (como na Síndrome de Turner), na perda de massa muscular e caquexia provocada por diversos infecção de câncer e HIV, tipos de anemia, endometriose, queimaduras (aumentando a síntese de colágeno e a atividade dérmica de fibroblastos), entre outras (BOFF, 2010; EVANS, 2004; YAVARI, 2009).

A maioria dos esteroides anabolizantes sintéticos disponíveis se origina da testosterona, a partir da manipulação de suas propriedades químicas, farmacocinética e biodisponibilidade. São usados na prática clínica ou por atletas, por possuírem propriedades anabólicas (BOFF, 2010). Desde quando a testosterona foi isolada de extratos de testículos em 1935, cientistas têm desenvolvido moléculas enfatizando efeitos anabólicos e prolongando sua atividade biológica para aumentar os valores terapêuticos, evitar o metabolismo de primeira passagem e facilitar a utilização sistêmica da molécula de testosterona (SHAHIDI, 2001; BAHRKE; YESALIS, 2004). Entre as muitas modificações feitas na testosterona, os EAA têm mostrado significante atividade anabólica e reduzida androgenicidade (DORNAS; NAGEM; OLIVEIRA, 2006).

A engenharia genética recentemente desenvolvida permitiu em alguns anos, produzir hormônios. Insulina, hormônio de crescimento e os esteroides anabolizantes são, dentre outros, facilmente produzidos por laboratórios especializados, e grande parte de sua distribuição escapa dos controles mínimos de saúde. Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona e hormônio de crescimento (hGH), estimulam a produção de proteínas celulares, que provocam um aumento no tamanho do músculo, força, potência e resistência (ARAMENDI; MANUEL, 2007).

A manipulação da molécula original de testosterona para formulação dos EAA influencia sua farmacocinética, biodisponibilidade e/ou o balanço da atividade androgênica em prol da anabólica (KUHN, 2002). Algumas dessas modificações estão citadas a seguir:

1. Testosterona administrada na forma injetável, através de adesivos transdérmicos ou cremes corporais;

2. Testosterona 17 β -esterificada (ésteres): cipionato de testosterona, propionato, enantato e undecanoato. A esterificação confere ao esteroide maior solubilidade lipídica e retarda a sua liberação para a circulação, prolongando a sua ação. Todos estes compostos, com exceção do undecanoato, devem ser administrados sob a forma injetável;

3. 17 α -derivados: metiltestosterona, metandrostenolona, nortandrolona, fluoximesterona, danazol, oxandrolona e estanozol. Estes derivados resistem ao metabolismo hepático, portanto são ativos quando administrados por via oral. A modificação está associada a níveis elevados de hepatotoxicidade;

4. Modificações nos anéis A, B ou C da molécula de testosterona: mesterolona, nortestosterona, metenolona, fluoximesterona, metandrostenolona, nortandrolona, danazol, nandrolona e estanozol. Estas modificações conferem grande número de vantagens ao EAA, que incluem: lenta metabolização, afinidade aumentada pelo receptor androgênico e resistência à aromatização a estradiol (Figura 4) (HALL; HALL, 2005; KUHN, 2002).

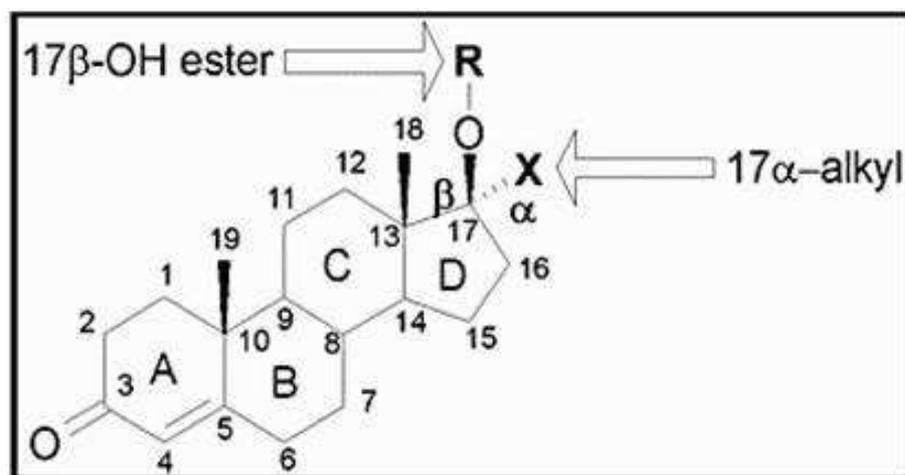


Figura 4. Possíveis formas de manipulação da molécula original de testosterona para formulação dos EAA (Adaptado de Yavari, 2009).

2.4 O uso indiscriminado dos EAA

O uso dos EAA destacou-se principalmente no meio esportivo, devido às propriedades anabólicas que promovem o aumento de massa muscular, o

desenvolvimento de força, da velocidade, de recuperação da musculatura e o controle dos níveis de gordura corporal, melhorando o desempenho físico (EVANS, 2004).

Na última década, os esteroides anabolizantes têm representado mais de 50% dos casos positivos de *dopping* entre atletas (FINESCHI et al., 2001). Entretanto, o que vem chamando mais atenção é o uso indiscriminado de esteroides anabolizantes na rotina de jovens escolares e praticantes da atividade física, principalmente em academias ou centros de práticas esportivas, expondo os usuários a riscos de saúde e de morte (PARKINSON; EVANS, 2006).

Nos últimos anos, principalmente entre os jovens, observa-se que os anabolizantes são comumente associados aos critérios de perfeição e melhor desempenho físico, vigentes na sociedade (IRIART; ANDRADE, 2002; LABRE, 2002; RUSSO, 2005). Contudo, com o objetivo de aumentar o processo anabólico celular, o crescimento muscular e a subsequente melhoria no desempenho físico em curtos intervalos de tempo, alguns praticantes tanto de exercícios físicos anaeróbios como aeróbios vêm fazendo uso indiscriminado de esteroides anabolizantes (KICMAN; GOWER, 2003).

No Brasil, o uso de EAA, substâncias estimulantes e narcóticos são consideradas *dopping* no esporte, segundo os critérios da Resolução n. 2, de 05 de maio de 2004, do Ministério do Esporte (BRASIL, 2004). A comercialização de tais substâncias é regulamentada pela Portaria 344, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998). Assim, a obtenção de andrógenos anabólicos em estabelecimentos farmacêuticos somente poderia ser realizada por meio de receituário branco em duas vias. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) editou a lei 9.965, de 27 de abril de 2000 que visa restringir, ainda mais, a venda de andrógenos e peptídeos anabólicos no território nacional (BRASIL, 2000). No entanto, o uso ilícito de esteroides anabolizantes entre adolescentes e adultos continua a ser um problema importante de saúde pública, mas não tem levantado grande interesse das autoridades da saúde (HALL; HALL, 2005; SJÖQVIST; GARLE; RANE, 2008). Podendo qualquer jovem estocar essas substâncias consideradas ilegais, quando não utilizadas para uso médico, pois as pessoas têm acesso a um grande mercado online. Há também aqueles que adquirem essas substâncias em algumas academias e lojas esportivas,

colocando em risco a saúde e a integridade das pessoas (ARAMENDI; MANUEL, 2007).

Nos Estados Unidos, estimativas recentes indicam a existência de 3 milhões de usuários. De 2,7 a 2,9% dos jovens adultos americanos usaram anabolizantes pelo menos uma vez em suas vidas (IRIART; CHAVES; ORLEANS, 2009). Em estudos realizados nos Estados Unidos, verificou-se que, aproximadamente, 4 a 6% dos estudantes universitários do sexo masculino utilizam EAA. Em relação à população jovem feminina, cerca de 1 a 2% relataram uso de EAA, com aumento significativo na última década (FRIZON; MACEDO; YONAMINE, 2006).

Quando usados de forma ilícita e abusiva para o aumento da massa muscular, os EAA são geralmente administrados em doses suprafisiológicas que podem chegar a 500mg/dia em ciclos que duram entre 4-6 meses. As doses e combinações usadas por atletas são de 10-100 vezes maiores que as doses terapêuticas (KARBALAY-DOUST et al., 2007; TAN; SCALLY, 2009). Os usuários costumam fazer o uso em ciclos, em que doses maiores são aplicadas progressivamente, com um intervalo de tempo que pode variar de 4 a 18 semanas (ARAÚJO, ANDREOLO; SILVA, 2002).

A principal preocupação em relação ao aumento da frequência do uso de EAA entre adolescentes e praticantes de atividade física em geral se deve à grande quantidade de efeitos adversos que essas substâncias podem causar nos diversos órgãos e sistemas, provocando danos reversíveis e irreversíveis tanto em homens como em mulheres, podendo causar até a morte (FERREIRA et al., 2007).

Durante o uso dos esteroides anabolizantes, ocorre acentuada diminuição ou atrofia do volume testicular, diminuição da fertilidade, produzindo um efeito deletério na secreção gonadotrófica, interferindo na espermatogênese, aumentando a libido e tendo uma diminuição da testosterona endógena (KOZIRIS, 2000; TELOKEN; BADALOTTI; PALKA, 2000). Além de provocar euforia, irritabilidade, comportamento agressivo, depressão, psicose, hipertrofia do ventrículo esquerdo do coração, ginecomastia, dor testicular, infertilidade, hipertrofia da próstata e anemia ferropriva (ARAÚJO, ANDREOLO; SILVA, 2002; FERRARI, 2011; RIBEIRO, 2001).

2.5 *Estanozolol*

Winstrol é o nome comum para a droga estanozolol, também conhecida como Winstrol depot ou Stromba. O estanozolol é um esteroide derivado alfa alquilado (17α -) desenvolvido para administração oral, mas geralmente disponível na forma injetável. É classificado como um anabolizante que exibe baixo efeito colateral. Indicado na terapia de anemias, asma, artrite reumatoide, anorexia rebelde, fraturas de lenta consolidação, osteoporose, queimaduras extensas, períodos pré e pós-operatório etc (SANTOS, 2003).

O estanozolol por ser considerado um esteroide “fraco” entre os atletas é geralmente combinado com outros anabólicos. Sendo principalmente utilizado na fase de definição muscular (SANTOS, 2003). No entanto, para outros atletas esse anabolizante é preferido por causar aumento de força sem ganho de peso em excesso, promover aumento na vascularização, e não se converter em estrógeno. Ele também não causa retenção de água em excesso, e mesmo às vezes parece ter um efeito diurético, além de ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular, embora isto não tenha sido provado cientificamente (WILLIAMSON; CONE; HUARD, 1995).

Em estudo realizado por Silva; Moureau (2003), em academias de São Paulo-SP, o EAA preferencialmente utilizado pela maioria dos usuários (77%) e ex-usuários (86%) foi o estanozolol. Frizon; Macedo; Yonamine (2006) e Maior et. al. (2009) através de pesquisas em algumas cidades do Rio Grande do Sul, concluíram que o estanozolol estava entre os três EAA mais utilizados nas academias.

Segundo Santos (2003) os esteroides injetáveis são considerados “seguros” pelos usuários, pois não precisam ser ingeridos, já que a droga na forma oral apresenta alta toxicidade ao fígado, no entanto o estanozolol por ser um 17α -, assim como a maioria dos EAA injetáveis, também apresenta alta toxicidade hepática.

2.6 *EAA e o aparelho reprodutor masculino*

O testículo é um órgão constituído morfofuncionalmente de dois compartimentos: intersticial, contendo células e fibras do tecido conjuntivo, vasos

sanguíneos e linfáticos e células de Leydig (secretoras de testosterona), e tubular, contendo túbulos seminíferos, no interior dos quais há a formação do gameta masculino, processo denominado de espermatogênese. A parede externa dos túbulos é formada por células mióides e células endoteliais. Sobre a lamina basal se apoia o epitélio germinativo e as células de Sertoli. As células de Sertoli, além de prover suporte estrutural para o epitélio germinativo, possui um importante papel no suporte de processos bioquímicos através da “barreira hemato-testicular” formada por complexos de junções ocludentes entre células de Sertoli adjacentes (RUSSEL et al., 1990).

Os andrógenos desempenham um papel essencial no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos, como os testículos, o epidídimo, canal deferente, vesícula seminal, próstata e pênis. A testosterona e a DHT têm papéis seletivos na diferenciação sexual masculina durante a embriogênese. A testosterona media à diferenciação do ducto de Wolff, enquanto DHT atua na diferenciação da próstata e na genitália externa masculina. Além disso, os andrógenos são necessários para a puberdade, fertilidade e função sexual masculina (DOHLE; SMIT; WEBER, 2003; ZHU, 2005).

Vários experimentos em modelos animais e humanos demonstram que abuso de EAA pode levar a graves e irreversíveis danos a vários órgãos. Entre os efeitos adversos mais comuns do abuso no uso de EAA, estão os relacionados à fertilidade masculina. Tais alterações no sistema reprodutor parecem ser reversíveis após descontinuação do uso da droga (DOHLE; SMIT; WEBER, 2003; KARBALAY-DOUST et al., 2007; ODA; EL-ASHMAWY, 2012). A literatura reporta ainda que o uso dos esteroides anabolizantes pode supri a liberação das gonadotrofinas LH e FSH (ALEN; REINILA; VIHKO, 1985; BRANN; PUTNAM; MAHESH, 1990; SMALL et al., 1984).

O efeito de esteroides anabolizantes na espermatogênese ocorre através de um *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise inibindo a secreção hipotalâmica do GnRH e conseqüentemente do FSH e LH da hipófise. Podendo os EAA provocar o hipogonadismo hipogonadotrófico (ABRIL et al., 2005)

Chimento et al. (2011) em cultura de células tumorais de Leydig concluiu que os EAA são potencialmente perigosos devido a efeitos produzidos na ativação de

vias envolvidas na progressão de cânceres, podendo promover principalmente o desenvolvimento de tumor testicular.

Bronson, Nguyen e De La Rosa (1996) utilizando ratos, machos e fêmeas adultos, expostos a uma combinação de quatro EAA durante seis meses, verificaram redução no peso das gônadas em ambos os sexos. O tratamento com os esteroides bloqueou a ejaculação na maioria dos ratos machos, sem influenciar outras facetas de seu comportamento sexual. Em pesquisas realizadas por Oda e El-Ashmawy (2012), testando os efeitos do Boldenona (EAA utilizado ilegalmente entre fisiculturistas e em cavalos) sobre as funções reprodutivas em coelhos machos, demonstraram que esse anabolizante causou significativa redução no peso testicular, no nível de testosterona, o volume seminal, motilidade espermática e contagem de espermatozoides. Exercendo desta forma efeito prejudicial significativo sobre as funções reprodutoras desses animais.

Em estudos realizados por Torres-Calleja et al. (2001) sobre efeito da utilização de EAA em relação ao número e morfologia de espermatozoides no ejaculado de 30 fisiculturistas adultos, foi observado que três deles apresentaram azoospermia, dois tiveram polizoospermia, oito apresentaram contagens abaixo de 20 milhões, enquanto que apenas dois tinham contagens de espermatozoides normais. Em relação à morfologia dos espermatozoides, verificou-se que apenas três dos indivíduos apresentaram espermatozoides morfologicamente normais. Entretanto os mecanismos de ação destas drogas são ainda controversos e muitos dos efeitos colaterais do uso de EAA continuam desconhecidos, apesar dos diversos já relatados (ROCHA; ROQUE; OLIVEIRA, 2007; SJÖQVIST; GARLE; RANE, 2008).

2.7 Apoptose celular

A apoptose celular é um processo fisiológico normal, pelo qual células privadas de fatores de sobrevivência, lesadas ou senescentes cometem suicídio, um tipo de morte celular programada. Através da apoptose o organismo controla e mantém constante o número de celular em tecidos e órgãos, livra-se de células danificadas e, ainda, elimina células indesejáveis e não permanentes de tecidos em

desenvolvimento, no decorrer da morfogênese (ABRAHAM; TRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MITCHELL, et al., 2006).

Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas específicas. Tais alterações incluem a compactação da célula, incluindo núcleo, que, junto com o citoplasma, também diminui de volume e, ao microscópio, aparece condensado e escuro (núcleo picnótico), perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, fragmentação da cromatina e decompõem-se em pequenas vesículas (brotamentos citoplasmáticos) denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados pelos macrófagos ou outras células (ABRAHAM; TRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Existem dois meios distintos de indução na morte por apoptose: indução intracelular (intrínseca) e estímulos extracelulares (extrínseca) (Figura 5).

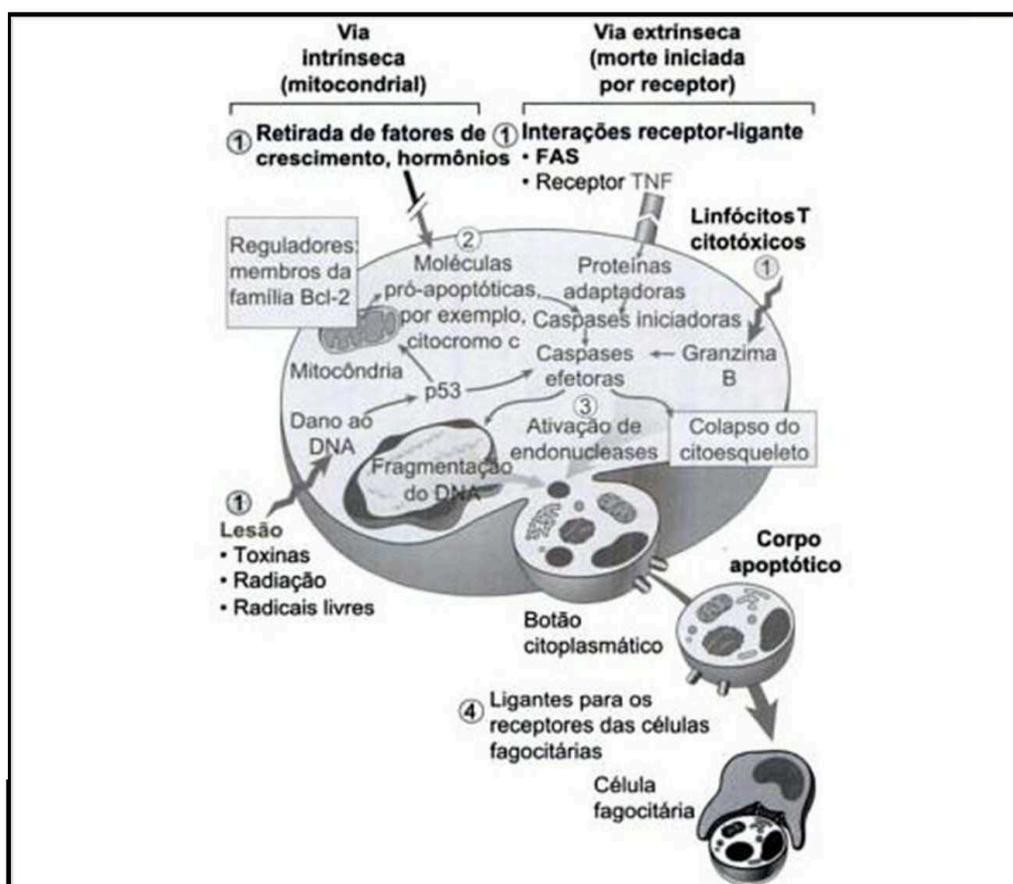


Figura 5. Mecanismo da apoptose (Adaptado de Mitchell, et al., 2006).

Através da via intrínseca, a qual envolve a participação da mitocôndria, pode-se observar a translocação de proteínas pró-apoptóticas da família das célula-B de linfoma 2 (Bcl-2) do citosol para a mitocôndria com a consequente formação de poros na membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol. O citocromo c presente no citosol liga-se à proteína reguladora da apoptose (Apaf-1) e em seguida à pró-caspase-9. Este complexo é chamado de apoptossoma e promove a ativação da pró-caspase-9 através de uma reação que requer hidrólise do ATP. Subsequentemente, a caspase 9 leva à ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (OLSON; KORNBLUTH, 2001; PASTERNAK, 2002). A ativação de uma cascata de caspases pode então ativar DNases que são responsáveis pela clivagem do DNA em fragmentos internucleossômicos (NAGATA, 2000).

A via extrínseca desenvolve de maneira independente da formação do apoptossoma. A ligação de moléculas como a proteína Fas e fator de necrose tumoral (TNF) à seus receptores de superfície pode ativar a via extrínseca, com o recrutamento de moléculas adaptadoras e a ativação direta da caspase-8. Uma vez ativada, a caspase-8 pode processar e ativar outras caspases levando à destruição celular (OLSON; KORNBLUTH, 2001).

Há outra importante família intracelular de regulação na apoptose, a família IAP (proteínas inibidores da apoptose). Estas proteínas agem inibindo a apoptose através de duas vias: elas evitam a ativação de algumas procaspases se ligando a elas, e inibem a atividade das caspases se ligando a elas (ALBERTS et al., 2004). Assim, a homeostase (equilíbrio estrutural e funcional essencial para sobrevivência de uma população celular) depende do balanço entre a ativação de moléculas pró e anti-apoptóticas (CHOI et al., 2002; KIM; BLANCO, 2007).

A apoptose também pode ocorrer em vários órgãos em resposta a hipoxia/isquemia, estresse oxidativo, ou lesão induzida por droga (ZAUGG et al., 2001). Sabe-se ainda que a falta de alguns hormônios ou fatores de crescimento podem levar as células-alvo a apoptose. Sendo ainda um mecanismo de defesa do organismo quando o DNA de uma célula passa por mutação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Em 2009, Shokri et al. verificou que o exercício físico associado à doses suprafisiológicas de decanoato de nandrolona em ratos, aumenta a extensão das

mudanças apoptóticas causadas pelos EAA no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, afetando a fertilidade. Além de induz o aumento transitório da taxa apoptótica de células de Leydig através de mecanismo associado com receptor de andrógeno, provavelmente envolvendo indução óxido nítrico sintetase 2 (NOS2) e a diminuição no potencial de membrana mitocondrial (JANJIC et al., 2012).

Pesquisas têm demonstrado ainda que o estanozolol promove apoptose em outros tipos de células, como por exemplo, condrócitos e miócitos. Sendo a produção de óxido nítrico (NO) intimamente correlacionada com a indução da apoptose (ZAUGG et al., 2001; ZHU, 2011).

2.8 Proliferação Celular

A proliferação celular é um processo biológico de vital importância para o organismo que pode ser definido como aumento do número de células por divisão celular (TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002). O ciclo celular é uma sequência de processos altamente ordenados que resultam na duplicação de uma célula. Nesses processos, complexos proteicos compostos de ciclinas e quinases ativadas ciclina-dependente, desempenham um importantíssimo papel. Determinação de proteínas no controle da proliferação de células contribui para uma melhor compreensão das transformações celulares e dos mecanismos de proliferação (ALBERTS et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os marcadores imunohistoquímicos mais utilizados para estudar a proliferação celular são: o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno Ki-67 (ARISAWA et al., 1999).

O Ki-67 é uma proteína nuclear e nucleolar presente em células em proliferação, mas não em repouso (ENDL; GERDES, 2000; KREITZ et al., 2000). Sua expressão começa a ser detectada na fase S do ciclo células, aumenta na fase G2, atingindo seu maior pico na fase M. Após a divisão, a célula retorna a fase G1 e os níveis da Ki-67 diminuem progressivamente (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000). A imunopositividade para a Ki-67 aparece localizada no núcleo e/ou regiões perinucleares (BACCHI; GOWN, 1993).

A mutação ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular pode resultar em modificações progressivas da biologia celular

caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). Sejam endógenos ou exógenos, os hormônios estimulam a proliferação celular predispondo às alterações genéticas (HENDERSON; FEIGELSON, 2000).

Zhu et al. (2011) demonstraram que o estanozolol regula a proliferação de condrócitos do disco epifisário em ratos adolescentes tratados com um analógico hormônio liberador de gonadotrofinas.

As LNCaP (Linhagem de células cancerígenas da próstata de humanos) foram utilizadas para comparar os efeitos de quatro tipos de EAA, as quais mostraram uma estimulação significativa de todos os quatro esteroides em relação aos ensaios de proliferação celular (ARNOLD et al. 2005). Além disso, em resposta à administração de testosterona, um aumento no número de células PCNA positivas ocorre no músculo esquelético humano, indicando que a testosterona pode promover a proliferação dessas células (SINHA-HIKIM et al., 2006).

Embora existam diversos estudos sobre o mecanismo molecular da ação dos hormônios esteroides, ainda não está claro como estes estimulam a proliferação de células. Em parte, isso é resultado da capacidade que o estradiol e a testosterona possuem em regular a expressão de muitas proteínas envolvidas no controle da proliferação das células, o que torna difícil identificar os alvos cruciais. Alguns desses alvos são fatores de crescimento e/ou os seus receptores que sugerem que os efeitos mitogênicos de esteroides podem ser mediados por mecanismos autócrinos ou parácrinos indiretos (CLARKE; DICKSON; LIPPMAN, 1991, ROBERTS; SPORN 1992). Alternativamente os esteroides regulam a expressão de certas ciclinas ou inibidores de quinase, podendo controlar a progressão do ciclo celular diretamente (ALTUCCI et al., 1996; MUSGROVE; SUTHERLAND, 1994; ZWIJSEN et al., 1997).

2.9 Angiogênese

A angiogênese é um processo complexo com vários estágios, os quais envolvem o remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais e musculares lisas, e a diferenciação capilar para formar novos

vasos sanguíneos (FOX; GATTER; HARRIS, 1996; OLIVEIRA et al., 2010; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). Os vasos neoformados surgem a partir de vasos preexistentes e este processo mantém-se durante toda a vida do indivíduo, respondendo sempre que necessário a alterações na demanda de oxigenação tecidual (SCOTT, 2000).

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é uma glicoproteína homodimérica, liberada por células endoteliais, fibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos, que induz a angiogênese atuando diretamente nas células ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares, os quais resultam em proliferação, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, assim como aumento da permeabilidade vascular (HICKLIN; ELLIS, 2005; ROY; BHARDWAJ; YLA-HERTTUALA, 2006).

O VEGF existe em cinco isoformas: VEGF-A, VEGFB, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PGF). Eles compartilham uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF. Sua biodisponibilidade depende da sua isoforma, do local de secreção e da ligação à heparina. O balanço entre o VEGF livre e ligado tem importantes implicações locais e sistêmicas. Destes, o VEGF-A, ou apenas VEGF, é o fator mais bem estudado e compreendido (BAO et al., 2008; CAO et al., 1999.; FALLER, 1999; GÜRKAN; TANRIVERDI; BALAMILI, 2005; KERBEL, 2008).

A sinalização pelo VEGF-A representa a etapa condicionante da angiogênese fisiológica. O VEGF-A promove o crescimento endotelial em artérias, em veias e em vasos linfáticos, além de responsabiliza-se pela manutenção da sobrevivência dos endoteliócitos, prevenindo sua apoptose; aumenta a permeabilidade vascular, indispensável para a angiogênese; causa vasodilatação *in vitro*, dependente de óxido nítrico derivado do endotélio; estimula o recrutamento de células inflamatórias e a expressão de proteases implicadas na degradação da matriz extracelular durante a angiogênese (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). O VEGF é membro de uma família de citocinas e exerce funções na angiogênese fisiológica e

patológica e na linfangiogênese (GEIGER et al., 2000; TAMMELA et al., 2003; XIA et al., 2003).

Vários estudos implicaram que esteroides sexuais são importantes fundamentais para regulação de VEGF nos tecidos sensíveis a hormônios. *In vitro*, a privação de andrógenos das LNCaP conduziu a uma diminuição da expressão da proteína VEGF (STEWART et al., 2001).

Apesar da influência dos esteroides anabólicos na angiogênese ainda ser escassa, Carvalho e Okamoto (1985) afirmam que os EAA aceleram a quantidade de vasos neoformados. A presença de VEGF no sistema reprodutor masculino foi demonstrada, através da técnica de imunohistoquímica, em epidídimo, testículos, células de Leydig e de Sertoli, em humanos adultos (ERGÜN et al., 1998; NALBANDIAN et al., 2003).

É bem conhecido que as células de Leydig segregam VEGF e possuem receptores de VEGF 1 (VEGFR1) e 2 (VEGFR2), os quais são expressos em vasos sanguíneos (ERGÜN et al., 1998; NALBANDIAN et al., 2003). Apesar da sua semelhança estrutural estes dois receptores de VEGF são funcionalmente diferentes: o VEGFR-2 é necessário para o desenvolvimento da linhagem endotelial enquanto que VEGFR-1 desempenha um papel importante na organização do endotélio vascular (THOMAS; DALE, 2000).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, L. K.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 101-105 p.
- ABRIL, L. T. et al. Manejo de la esterilidad masculina en pacientes consumidores de esteroides anabolizantes. **Archivos Españoles de Urología**. v. 58, n. 3, p. 241-244, 2005.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALEN, M.; REINILA, M; VIHKO, R. Response of serum hormones to androgen administration in power athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 17, n. 3, p. 354-359, 1985.
- ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovasc Research**. v. 65, n. 3, p. 550-563, 2005.
- ALTUCCI, L. et al. 17-betaestradiol induces cyclin d-1 gene-transcription, p36(d1)-p34 (cdk4) complex activation and p105(rb) phosphorylation during mitogenic stimulation of g(1)-arrested human breastcancer. **Oncogene**. v.12, n. 11, p. 2315-2324, 1996.
- ARAMENDI, G.; MANUEL, J. Uso y abuso de esteroides anabolizantes. **Osasunaz**, v. 8, p. 185-197, 2007.
- ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, J.; SILVA, M. S. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v. 10, n. 3, p. 13-18, 2002.
- ARISAWA, E. A. et al. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67- Breve Revisão. **Revista de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia**. v. 2, n.1, p. 54-60, 1999.
- ARNOLD, J. T. et al. Comparative effects of DHEA vs. testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**. v. 288, n. 3, p. 573-584, 2005.
- BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cellproliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical Research**. v. 26, n. 7, p. 677-687, 1993.
- BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 4, n. 6, p. 614-620, 2004.
- BAO, P. et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**. v. 153, n. 1016, p. 347-358, 2008.
- BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 93, n. 1, p. 43-48, 2005.
- BOFF, S. R. Esteroides anabólicos e exercício: Ação e efeitos colaterais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v.18, n. 1, p. 81-88, 2010.

- BRANN, D. W.; PUTNAM, C. D.; MAHESH, V. B. Similarities and differences in progesterone and androgens in modulation of LH, FSH, and PRL release: unexpected properties of flutamide. **Journal of Steroid Biochemistry**. v. 36, n. 4, p. 287-294, 1990.
- BRASIL. Lei de Restrição à Venda de Anabolizantes. **Diário Oficial da União**. Lei n. 9.965, p.60-61, de 27 de abril de 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Portaria 344, p.50-64, de 12 de maio de 1998.
- BRASIL. Ministério do Esporte. **Diário Oficial da União**. Resolução n.2, p.100-103, de 5 de maio de 2004.
- BRONSON, F. H.; NGUYEN, K. Q.; DE LA ROSA, J. Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. **Physiology & Behavior**. v. 59, n. 1, p. 49–55, 1996.
- BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K. **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis os therapeutics**. 11. ed. 2006, 1291-1358 p.
- CAO, J. et al. Angiogenic factors in human proliferative sickle cell retinopathy. **British Journal of Ophthalmology**. v. 83, n. 7, p. 838-846, 1999.
- CARVALHO A. C. P; OKAMOTO T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas da extração dental. **Revista Odontológica**. v. 14, n. 1-2, p. 27-33, 1985.
- CHIMENTO, A. et al. Nandrolone and stanozolol induce leydig cell tumor proliferation through na estrogen-dependent mechanism involving igf-i system. **Journal of Cellular Physiology**. v. 227, n. 5, p. 2079-2088, 2011.
- CHOI, B. M. et al. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, n. 1, p.116-126. 2002.
- CLARKE, R.; DICKSON, R. B.; LIPPMAN, M. E. The role of steroid hormones and growth factors in the control of normal and malignant breast. **Nuclear Hormone Receptors**. p. 297- 319, 1991.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1400p.
- CUNHA, T. S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 2, p.165-179, 2004.
- DOHLE, G. R.; SMITH, M.; WEBER, R. F. A. Androgens and male fertility. **World Journal of Urology**, v. 21, n. 5, p. 341-345, 2003.
- DORNAS, W. C.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T. Considerações sobre efeitos do uso de esteróides anabólicos androgênicos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.87, n. 1, p.3-8, 2006.
- ENDL, E.; GERDES, J. Tem Ki-67 protein: fascinating forms and na unknown function. **Experimental Cell Research**. v. 257, n. 2, p. 231-237, 2000.

- ERGÜN, S. et al. Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human epididymis. **Biology of Reproduction**. v. 58, n. 1, p. 160-168, 1998.
- EVANS, N. A. Currents concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 32, n. 2, p. 534-542, 2004.
- FALANGA, V. et al. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 111, n.6, p. 1193-7, 1998.
- FALLER, D. Endothelial cell responses to hypoxic stress. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 26, n. 1, p. 74-84, 1999.
- FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**. v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.
- FERRARI, C. K. B. Abuso de hormônios esteroides anabólicos: o que não contaram para você! **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. v. 6, n. 3, p. 59-69, 2011.
- FERREIRA, U. M. G. et al. Esteroides anabólicos androgênicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 20, n. 4, p. 267-275, 2007.
- FINESCHI, V. et al. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 125, n. 2, p. 253-255, 2001.
- FOX, S. B.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. I. Tumor angiogenesis. **The Journal of Pathology**. v. 179, p. 232-237, 1996.
- FRIZON, F; MACEDO, S. M. D; YONAMINE, M. Uso de esteroides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 26, n. 3, p. 227-232, 2006.
- GAO, W. et al. Selective androgen receptor modulator (SARM) treatment improves muscle strength and body composition, and prevents bone loss in orchidectomized rats. **Endocrinology**. v. 146, p. 4887-4897, 2005.
- GAO, Y.; BOHL, C. E.; DALLON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical Reviews**. v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2007.
- GARDINER, D. G.; SHOBACK, D. **Endocrinologia básica e clínica de Greenspan**. 9. ed. Artmed. p. 426-432, 2013.
- GEIGER, R. et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. **Journal of Pathology**. v. 191, n. 2, p. 202-207, 2000.
- GÜRKAN, E.; TANRIVERDI, K.; BALAMILI, F. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor levels in Sickle Cell Disease. **Annals of Hematology**. v. 84, n. 2, p. 71-75, 2005.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E **Textbook of Medical Physiology**, 11. ed. Philadelphia: sanders, 2006, 92-93 p.

- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Funções reprodutoras e hormônios masculinos. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 80, p. 911-924.
- HALL, R. C. W.; HALL, R. C. W. Abuse of Supraphysiologic Doses of Anabolic Steroids. **Southern Medical Journal**. v. 98, n. 5, p. 550-555, 2005.
- HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.
- HIORT, O. Androgens and puberty. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 16, n. 1, p. 31-41, 2002.
- IRIART, J. A. B; CHAVES, J. C; ORLEANS, G. R. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 25, n. 4, p.773-782, 2009.
- IRIART, J. A.; ANDRADE, T. M. Musculação. Uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, n. 5, p.1379-1387, 2002.
- JANJIC, M. M. et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following *in vivo* exposure. **Reproductive Toxicology**. v. 34, n. 4, p. 686-693, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 171-227 p.
- KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. JR. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern?. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 98, n. 1, p. 1-12, 2008.
- KARBALAY-DOUST, S. et al. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. **Asian Journal of Andrology**. v. 9, n. 2, p. 235-239, 2007.
- KERBEL, R. S. Tumor Angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**. v. 358, n. 19, p. 2039-49, 2008.
- KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**. v. 154, n. 3, p. 502-521, 2008.
- KICMAN, A. T.; GOWER, D. B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 321-356, 2003.
- KIM, H. A, BLANCO, F. J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. **Curr Drug Targets**. v. 8, n. 2, p. 333-345, 2007.
- KOZIRIS, L. P. Anabolic-Androgenic Steroid Abuse. **The Physican and Sports Medicine**. v. 28, n. 12, p. 67-68, 2000.

- KREITZ, S. et al. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. **Experimental Cell Research**. v. 261, n. 1, p. 284-292, 2000.
- KUHN, C. M. Anabolic Steroids. **Recent Progress Hormone Research**. v. 57, n.1, p. 411-434, 2002.
- LABRE, M. P. Adolescent boys and the muscular male body ideal. **Journal of Adolescent Health**. v. 30, n. 4, p. 233-242, 2002.
- LIU, S. C.; KLEIN-SZANTO, A. J. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**. v. 36, n. 2, p. 145-151, 2000.
- MAIOR, A. S. et al. Uso de esteroides anabólicos em duas cidades do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**. v. 3, n. 18, p. 580-591, 2009.
- MARQUES, M. A.; PEREIRA, H. M. G.; AQUINO NETO, F. R. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 9, n. 1, p. 15-24, 2003.
- MITCHELL, R. N. et al. **Robbins & Cotran: fundamentos de patologia**. São Paulo: Elsevier, 9. ed. 2006, 03-23 p.
- MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Cell cycle control by steroid hormones. **Seminars in Cancer Biology**. v. 5, n. 5, p. 381-389, 1994.
- NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Experimental Cell Research**. v. 256, n. 1, p. 12-18, 2000.
- NALBANDIAN, A. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. **Biology of Reproduction**. v. 69, n. 3, p. 985-994, 2003.
- ODA, S. S.; EL-ASHMAWY, I. M.. Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 93, n. 3, p. 172-178, 2012.
- OLIVEIRA, L. B. O. et al. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vittale**. v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.
- OLSON, M.; KORNBLUTH, S. Mitochondria in apoptosis and human disease. **Current Molecular Medicine** . v.1, n. 1, p.91-122, 2001.
- PALVIMO, J. J. The androgen receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 352, n. 1-2, p. 1-3, 2012.
- PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38, n. 4, p. 644-51, 2006.
- PASTERNAK, J. J. **Genética molecular humana: mecanismos das doenças hereditárias**. 1. ed. Barieri: Malone, 2002, 374 p.
- RIBEIRO, P. C. P. O uso indevido de substâncias: esteroides anabolizantes e energéticos. **Associação Brasileira de Adolescência**. v. 2, n. 2, p. 97-101, 2001.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Mechanistic interrelationships between two superfamilies: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor- β . **Cancer Surveys**. v. 14, p. 205-220, 1992.

- ROCHA, F. L.; ROQUE, F. R.; OLIVEIRA, E. M. Esteroides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o Sistema Cardiovascular. **O Mundo da Saúde**. v. 31, n. 4, p. 470-477, 2007.
- ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLA-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett**. v. 580, n. 12, p. 2879-2887, 2006.
- RUSSELL, L. D.; SINHÁ-HIKIM, A. P.; ETTLIN, R. A.; CLEGG, E. D. **Evaluation of the testis: Histological and Histopathological**. 1 ed. Clearwater: Cache River Press, 1990, 286 p.
- RUSSO, R. C. T. Imagem corporal: construção através da cultura do belo. **Movimento & Percepção**. v. 5, n. 6, p. 80-90, 2005.
- SANTOS, A. M. **O mundo anabólico: Análise do uso de esteroides anabólicos nos esportes**. São Paulo: Manole. 2003. 42 p.
- SATO, T. et al. Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 300, n. 1, p. 167-71, 2003.
- SCOTT, F. G. **Developmental Biology**. 6. ed. New York: Sinauer, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9982/>> Acesso em: 25 jan 2014.
- SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical application of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**. v. 23, n. 9, p. 1355-1390, 2001.
- SHOKRI, S. et al. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 106, n. 4, p. 324-330, 2009.
- SILVA, L. S. M. F.; MOUREAU, R. L. M. Uso de esteroides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.
- SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteroides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.
- SINGH, R. et al. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in c3h 10t1/2 pluripotent cells through androgen receptor-mediated pathway. **Endocrinology**. v. 144, n. 3, p. 1259-1268, 2009.
- SINHA-HIKIM, I. et al. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 91, n. 8, p. 3024-3033, 2006.
- SJÖQVIST, F; GARLE, M; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **The Lancet**, v. 371, n. 9627, p. 1872-1982, 2008.
- SMALL, M. et al. Alteration of hormone levels in normal males given the anabolic steroid stanozolol. **Clinical Endocrinology**, v. 21, n. 1, p. 49-55, 1984.
- SOUCASAU, N. **Os Órgãos Sexuais Femininos**. Imago. 1993. Disponível em: < http://www.nelsonginecologia.med.br/andrestrowomen_port.htm >. Acesso em: 22 set. 2013.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Ciência Odontológica Brasileira**. v. 10, n. 1, p. 12-18, 2007.

STEWART, R. J. et al. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. **Journal of Urology**. v. 165, n. 2, p. 688-693, 2001.

TAN, R. S.; SCALLY, M. C. Anabolic steroid-induced hypogonadism – Towards a unified hypothesis of anabolic steroid action. **Medical Hypotheses**. v. 72, n. 6, p. 723-728, 2009.

TELOKEN, C.; BADALOTTI, M.; PALKA, M. T. F. Infertilidade Masculina. In: BENDHACK, A.; DAMIÃO, R. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: BG Cultural, 1999. Cap. 52, p. 305-312, 2000.

THOMAS, O. D.; DALE, A. Endothelial signal integration in vascular assembly. **Annual Review of Physiology**. v. 62, p. 649-671, 2000.

TORALDO, G. et al. Topical androgen antagonism promotes cutaneous wound healing without systemic androgen deprivation by blocking β -catenin nuclear translocation and cross-talk with TGF- β signaling in keratinocytes. **Wound Repair and Regeneration**. v. 20, n. 1, p. 61-73, 2012.

TORRES-CALLEJA, J. et al. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. **Life Sciences**, v. 68, n. 15, p. 1769–1774, 2001.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front human oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 31, n.10, p. 598-604, 2002.

WALKER, W.H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 365, n. 1546, p. 1557-1569, 2010.

WILLIAMSON, A. E.; CONE, L. A.; HUARD, G. S. Spontaneous necrosis of the skin associated with cryofibrinogenemia, cryoglobulinemia, and homocystinuria. **Annals of Vascular Surgery**. v. 10, n. 4, p. 365-369, 1995.

WILSON, J. D. A. In: GILMAN, A. G; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. Singapore: McGraw-Hill Book Co. p.1441-1457, 1996.

XIA, Y. P. et al. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. **Blood**. v. 102, n. 1, p. 161-168, 2003.

YAVARI, A. M. D. abuse of anabolic androgenic steroids. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**. v. 5, n. 3, p. 22-32, 2009.

ZAUGG, M. et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. **Journal of Cell Physiology**. v. 187, n. 1, p. 90-95, 2001.

ZHU, S. Y. et al. Stanozolol regulates proliferation of growth plate chondrocytes via activation of ERalpha in GnRHa-treated adolescent rats. **Journal of Pediatric Endocrinology Metabolism**. v. 24, n. 5-6, p. 275-281, 2011.

ZHU, Y. S. Molecular basis of steroid action in the prostate. **Cellscience**. v. 4, n. 1, p. 27-55, 2005.

ZWIJSEN R. M. L. et al. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. **Cell**. v. 88, n. 3, p. 405-415, 1997.

Capítulo II

Estudo histológico e imunohistoquímico do efeito da administração do estanozolol sobre testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal de ratos

Lilian B. Pereira¹, Ilka D. D. Sousa¹, Valéria W. Teixeira¹, Álvaro A. C. Teixeira^{1*}

¹ *Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Brasil*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

Resumo

A presente pesquisa analisou os efeitos do estanozolol sobre os testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal de ratos através dos seguintes parâmetros: índices organossomáticos, histologia, processos de angiogênese, apoptose e proliferação celular. Foram utilizados 21 ratos albinos, divididos nos seguintes grupos: ratos sem tratamento (G1),

ratos tratados com óleo de gergelim (GII) e ratos tratados com estanozolol (5mg/Kg) em óleo de gergelim (1 mL/kg), diariamente, 5 vezes por semana, por um período de 4 semanas consecutivas (GIII). Os resultados revelaram que houve uma redução significativa no peso dos órgãos e do índice organossomático nos animais tratados com estanozolol, além de alterações histológicas e imunohistoquímicas apenas nos testículos e próstata, caracterizadas pelo aumento do índice apoptótico, redução do índice de proliferação celular e imunomarcção mais intensa para a expressão do VEGF-A. Assim conclui-se que a administração diária de 5mg/Kg de estanozolol, cinco vezes por semana, no período de 4 semanas, pode levar a efeitos semelhantes a outros esteroides anabolizantes androgênicos os quais interferem no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal causando supressão hormonal (gonadotrofinas, testosterona, etc) e conseqüentemente redução ou atrofia dos órgãos hormônios-dependentes do aparelho reprodutor masculino.

Palavras-chave: anabolizantes, reprodução, apoptose, angiogênese, proliferação.

1. Introdução

A busca pelo corpo ideal é evidente na sociedade atual, a qual faz do corpo um instrumento moldável. Diversas são as formas de modelar, reparar, aumentar ou diminuir proporções, modificando-se a estética natural. Dentre os meios de se modelar mais utilizados estão os esteroides anabólico-androgênicos (EAA), que podem ser considerados uma via de "efeito rápido" para a obtenção do corpo desejado (Santos et al., 2006).

Os EAA são uma família de hormônios que incluem a testosterona e seus derivados sintéticos, os quais possuem tanto efeitos anabólicos quanto androgênicos. Assim, estimulam o crescimento muscular e a função do sistema reprodutor masculino através das suas

propriedades farmacocinéticas, biodisponibilidade e balanço entre suas atividades androgênicas e anabólicas (Marques, et al., 2003; Kanayama; Hudson; Pope, 2008).

Apesar dos EAA terem sido inicialmente desenvolvidos com fins terapêuticos, o abuso dos EAA para o aprimoramento no desempenho atlético e na aparência física é um crescente problema entre atletas profissionais e amadores, e tem se tornado um problema de saúde pública em muitos países. Quando usados de forma ilícita e abusiva para o aumento da massa muscular, os EAA são geralmente administrados em doses suprafisiológicas. Um homem normal produz cerca de 35-70 mg de testosterona por semana, enquanto os usuários EAA podem muitas vezes utilizar doses equivalentes a mais de 1000 mg de testosterona por semana, e às vezes até o equivalente de 3.000-5.000 mg (Evans, 2004; Janjic et al., 2012; Kanayama; Pope, 2012).

Estanozolol é um éster da testosterona [17- beta-hidróxi-17-alfa-metilandrostan-3,20-dione] que possui um grande potencial anabólico e uma degradação hepática mais lenta do que o hormônio masculino natural, está entre os três EAA mais utilizados em academias brasileiras, pois segundo os usuários ele prover o aumento de força sem ganho de peso em excesso, aumento da vascularização e ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular, além de ser o EAA que apresenta a maior relação anabólico-androgênica (30:1) (Williamson; Cone; Huard, 1995; Pey et al., 2003; Silva; Moureau, 2003; Frizon; Macedo; Yonamine, 2006; Maior et al., 2009).

Vários experimentos em modelos animais e humanos, no entanto, têm demonstrado que a administração de doses suprafisiológicas de EAA têm resultado em efeitos adversos em vários sistemas fisiológicos, principalmente ao sistema reprodutor masculino. Dentre eles, os mais comuns são infertilidade, atrofia testicular, hipertrofia prostática e carcinoma prostático. Tais alterações no aparelho reprodutor parecem ser reversíveis após descontinuação do uso

dos EAA (Iriart; Andrade, 2002; Labre, 2002; Dohle; Smit; Weber, 2003; Hartgens; Kuipers, 2004; Maravelias et al., 2005; Russo, 2005; Hoffman; Ratamess, 2006; Parkinson; Evans, 2006; Karbalay-Doust et al., 2007; Hoseini et al., 2009; Oda; El-Ashmawy, 2012). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência do uso indiscriminado do estanozolol sobre os seguintes parâmetros: 1. Índices organossomáticos; 2. Histologia; 3. Angiogênese; 4. Proliferação celular e 5. Apoptose celular, dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata em ratos adultos.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos animais

Foram utilizados 21 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), com 120 dias de idade, virgens, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os ratos foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o número: 23082.0227226/2013-69.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: GI - ratos sem nenhum tratamento (controle), GII - ratos tratados com óleo de gergelim (placebo) e GIII - ratos tratados com 5mg/kg de estanozolol diluído em óleo de gergelim.

2.2. Administração do estanozolol

Os animais do grupo III foram tratados com injeções subcutâneas (s.c.) de 5mg/Kg de estanozolol em óleo de gergelim 1 mL/kg como veículo, sendo 1 aplicação diária, 5 vezes por semana, por um período de 4 semanas consecutivas seguindo a metodologia descrita por Tucci et al. (2012). Enquanto os animais do grupo II receberam apenas o veículo.

2.3. Análise morfológica dos testículos, epidídimo, próstata e vesícula seminal.

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a última administração do tratamento. Para tanto, foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular (i. m.). Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas, para remoção dos testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata os quais foram pesados, e mergulhados em formol tamponado à 10%, permanecendo no mesmo por 48 horas. Em seguida os animais foram eutanasiados aprofundando-se a anestesia até a dose letal.

Após esses procedimentos os materiais foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em seqüência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.4 Índices Organossomático (IO)

O índice organossomático foi utilizado como um indicativo da ação do estanozolol, uma vez que os efeitos deste esteroide anabolizante nestes órgãos são previamente reportados. Para tanto foi calculado a razão entre o peso dos órgãos (testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal) pelo peso corpóreo de cada animal, para a obtenção de seus respectivos índices organossomáticos, como na figura abaixo:

Onde:

IO: Índice organossomático;

PO: Peso do órgão;

PC: peso corporal.

$$IO = \frac{PO}{PC} \times 100$$

2.5 Índice apoptótico (IA) e proliferação celular (IPC)

Foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados, em seguida incubados em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão de equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37° por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, Dako Cytomation™) (±20 minutos), sendo contracorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após as lâminas foram lavadas em água corrente,

desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz.

Para determinar a proliferação celular, foi utilizado o anticorpo Ki-67, SP6 (Spring) na diluição 1:100. Para tanto, foi realizada desparafinização em xilol e re-hidratação em álcool e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH=6) em banho maria por 20 minutos, a 100°C, com descanso das lâminas por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Após as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Foi aplicado sobre os cortes o peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, as lâminas foram lavadas e incubadas em Tris-Triton por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em Tris e incubados em BSA por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em Tris e incubadas no anticorpo primário por 1 hora em temperatura ambiente. Depois, as lâminas foram lavadas em Tris e incubadas em anticorpo secundário conjugado a peroxidase (N-Histofine simple stain max PO, Nichirei Biosciences) por 30 minutos. Após, os cortes foram lavados em Tris. A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, Dako Cytomation™) até os cortes ficarem escuros, sendo contracorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz.

O índice apoptótico e de proliferação celular foi determinado pelo percentual de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40x (Losa et al., 2000; Burcombe et al., 2006; Wu et al., 2013).

2.6 VEGF-A

Para avaliar a expressão do fator de crescimento vascular endotelial VEGF-A, foi utilizado o anticorpo VEGF-A (Dako, Denmark) na diluição 1:20. Para tanto, os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratação em álcool e água. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH=6) em forno de micro-ondas por 20 minutos, a 90°C, com descanso das lâminas por mais 20 minutos dentro do forno. Após lavagens em Tris, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena colocando sobre o material peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 30 minutos. Em seguida os cortes foram lavados com Tris-Triton e incubados em BSA (Albumina Sérica Bovina) por 30 minutos. Posteriormente incubados em anticorpo VEGF por duas horas em câmara úmida. Posteriormente sucessivas lavagens com Tris foram realizadas. Aproximadamente 100µL do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (N-Histofine simple stain max PO, Nichirei Biosciences) foi utilizado em cada corte. A reação foi revelada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, Spring®) até os cortes ficarem escuros (\pm seis minutos), sendo contracorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após lavagem em água corrente, o material foi desidratado com álcool 100% e xilol, em seguidas foram montadas e observadas em microscópio de luz.

2.7 Análise Estatística

Os dados obtidos dos pesos dos órgãos, dos índices organossomático, apoptótico e de proliferação celular foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 *Peso dos órgãos e índice organossomático (IO)*

A análise estatística do peso dos órgãos e do IO revelou que nos animais tratados com estanozolol, houve redução significativa em todos os órgãos estudados, quando comparados aos resultados dos grupos controle e óleo de gergelim (Tabela 1 e Fig. 1).

3.2 *Análise morfológica*

Testículos

Os testículos dos animais pertencentes aos grupos controle e óleo de gergelim apresentaram-se bem preservados, envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Contendo numerosos túbulos seminíferos, que se alojam como novelos dentro do tecido conjuntivo frouxo, formados por um epitélio germinativo apoiado sobre uma lâmina basal e tecido conjuntivo formado por fibroblastos e células mióides achatadas (Fig. 2A). Neste epitélio seminífero observaram-se numerosas espermatogônias em vários tamanhos, além da presença de células de Sertoli, apresentando morfologia piramidal, encontradas aderidas a lâmina basal dos túbulos, e suas extremidades apicais estão voltadas para o lúmen (Fig. 2B). No tecido intersticial dos testículos foram observadas ainda várias células de Leydig, entre os túbulos, caracterizadas por apresentarem citoplasma bastante corado e vacuolado, além de vasos sanguíneos (Figs. 2C e 2D).

Nos testículos dos animais do grupo estanozolol notou-se túbulos seminíferos com contornos irregulares, porém com os mesmos elementos celulares observados nos testículos dos animais dos grupos I e II (Figs. 2E e 2F).

Epidídimo

No epidídimo dos animais dos grupos controle e óleo de gergelim foi possível observar secções do ducto epididimário, contendo um grande volume de espermatozoides em sua região central (Figs. 3A e 3B). Revestindo o ducto observou-se um epitélio colunar pseudo-estratificado, composto por células basais arredondadas e células colunares cobertas por longos e ramificados estereocílios, apoiado em uma lâmina basal de células musculares lisas (Figs. 3C e 3D). Em torno do tubo pode-se notar a presença de tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos (Fig. 3C). No entanto, no epidídimo dos animais pertencentes ao grupo estanozolol observou-se uma aparente diminuição do tecido conjuntivo que envolve o ducto epididimário e ainda epitélio contendo um grande volume de células vacuolizadas (Fig. 3E e 3F).

Vesículas Seminais

Nas vesículas seminais dos animais dos grupos controle e óleo de gergelim foi evidenciada uma túnica adventícia, formada por tecido conjuntivo. Internamente verifica-se uma mucosa pregueada e forrada com epitélio de morfologia cuboide a pseudo-estratificado colunar, com lâmina própria fibroelástica (Figs. 4A e 4B). A lâmina própria encontra-se envolvida por uma delgada camada de músculo liso (Figs. 4C e 4D).

Nas vesículas seminais dos animais do grupo estanozolol observa-se um espessamento do tecido conjuntivo e do tecido muscular liso dos septos interglandulares, bem como o espessamento da capa média muscular, além de vários prolongamentos epiteliais (Figs. 4E e 4F).

Próstata

Na próstata dos animais dos grupos controle e óleo de gergelim observamos numerosas glândulas túbulo-alveolares ramificadas e bastantes preservadas, formadas por um epitélio variado de cuboide a pseudo-estratificado colunar (Figs. 5A e 5B). Verificou-se ainda uma cápsula fibromuscular, contendo inúmeras células musculares lisas, envolvendo toda a próstata. Notou-se que septos partem desta cápsula e penetram entre as glândulas túbulo-alveolares, dividindo-as em lóbulos (Figs. 5C e 5D). Quando comparadas aos grupos controle e óleo de gergelim, as glândulas prostáticas dos animais do grupo estanozolol mostraram-se menos volumosas, mas com estruturas histológicas preservadas (Figs. 5E e 5F).

3.3 Apoptose e índice apoptótico (IA)

O ensaio pelo teste de TUNEL foi positivo em todos os órgãos analisados, entretanto foi mais significativo nos testículos e próstatas dos animais tratados com estanozolol, os quais apresentaram os maiores IA (Figs. 6 e 7).

3.4 Índice de proliferação celular (IPC)

O índice de proliferação celular foi significativamente reduzido nos testículos e próstatas dos animais tratados com o estanozolol, não havendo diferenças significativas para o epidídimo e vesícula seminal (Fig. 8).

3.5 Expressão do VEGF A

A imunomarcação para a expressão do VEGF-A foi mais intensa no tecido conjuntivo peritubular nos testículos e no tecido conjuntivo da próstata dos animais tratados com

estanozolol. O epidídimo e a vesícula seminal não apresentaram diferenças na expressão desse fator de angiogênese (Fig. 9).

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) do peso dos órgãos (g) dos animais dos grupos experimentais.

GRUPOS	TESTÍCULOS	EPIDÍDIMO	V. SEMINAIS	PRÓSTATA
G I	1,25 \pm 0,09a	0,41 \pm 0,03a	0,51 \pm 0,02a	0,59 \pm 0,01a
G II	1,36 \pm 0,12a	0,40 \pm 0,04a	0,50 \pm 0,02a	0,60 \pm 0,02 a
G III	1,06 \pm 0,08b	0,33 \pm 0,01b	0,38 \pm 0,05b	0,54 \pm 0,02b

*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P > 0,05$).

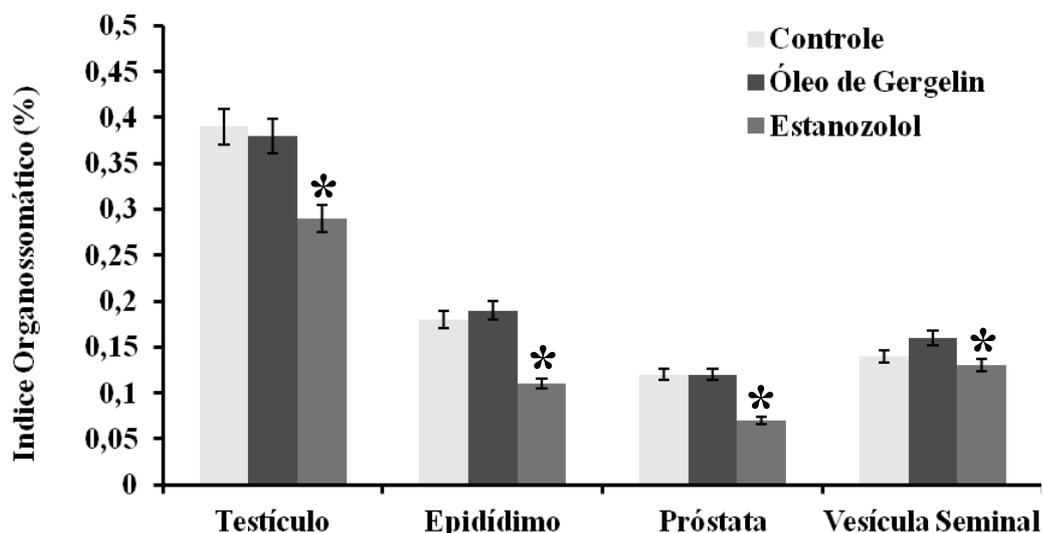


Figura 1: Gráfico do Índice organossomático (IO) dos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

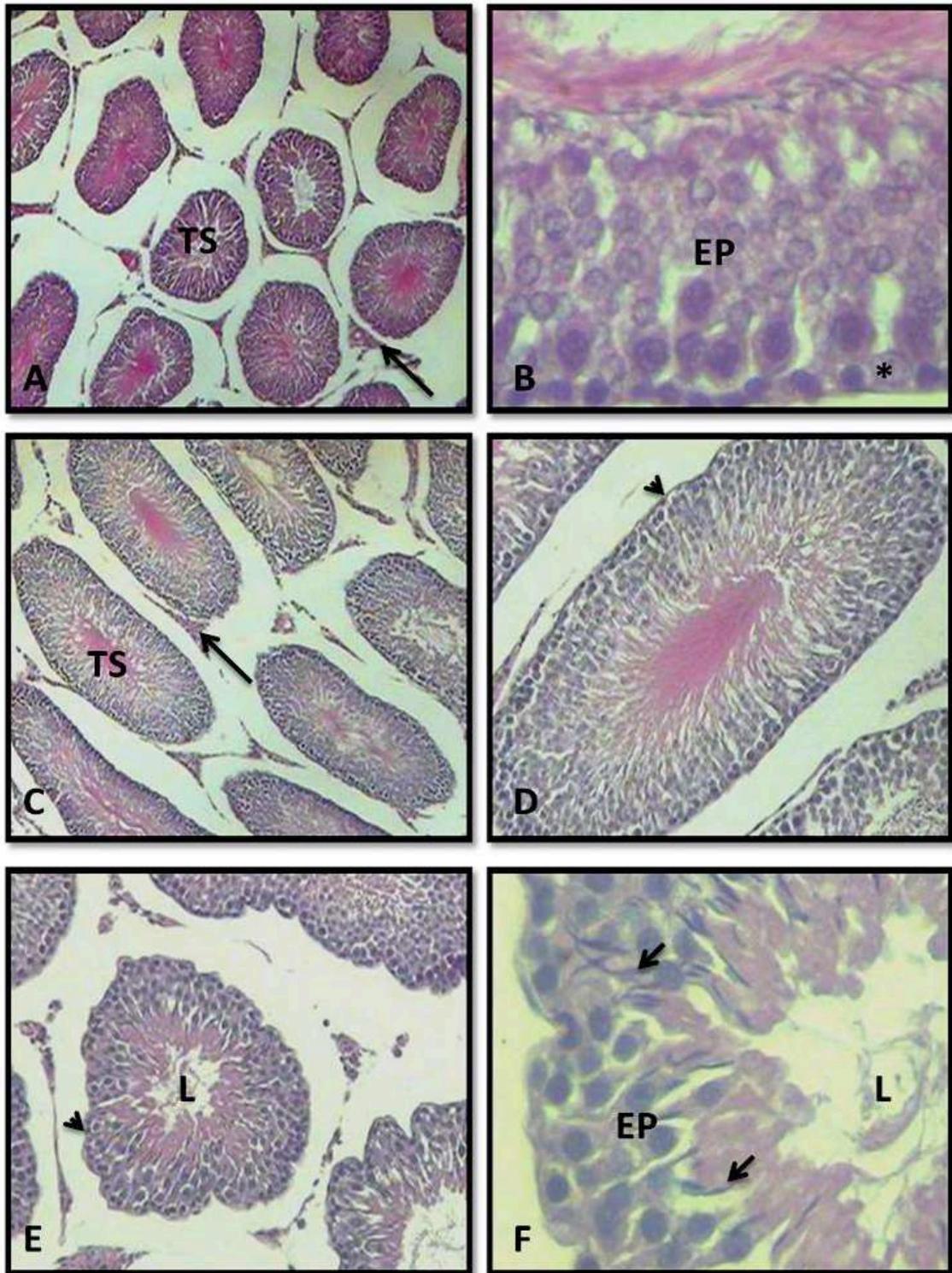


Figura 2: Fotomicrografia de cortes de Testículos dos animais dos grupos experimentais. A - Túbulos seminíferos (GI). Aumento 42X. B - Epitélio seminífero (GI). Aumento 428X. C - Túbulo seminífero (GII). Aumento 42X. D - Túbulo seminífero (GII). Aumento 107X. E - Túbulos seminíferos (GIII). Aumento 107X. F - Detalhe epitélio seminífero (GIII). Aumento 428X. Seta longa - tecido intersticial; Cabeça de seta- lâmina basal; Seta curta - Espermatozoides; TS- Túbulos seminíferos; EP - epitélio seminífero; *- Células de Sertoli; L - Lúmen. Coloração H.E.

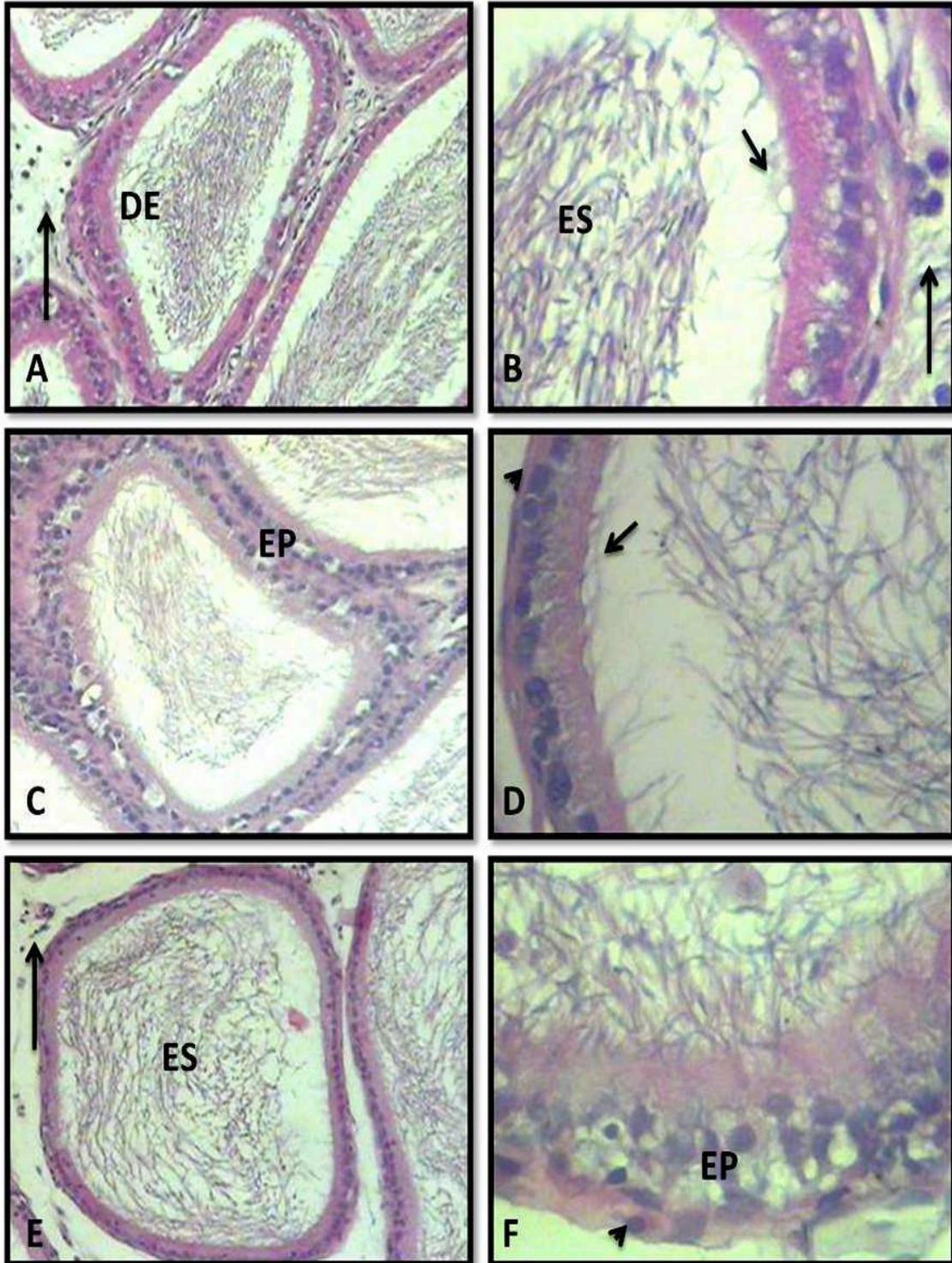


Figura 3: Fotomicrografia de cortes dos epidídimos dos animais dos grupos experimentais. A - Ducto epididimário (GI). Aumento 107X. B - Detalhe do epitélio (GI). Aumento 428X. C - Epidídimo (GII). Aumento 107X. D - Epitélio do epidídimo (GII). Aumento 428X. E - Epidídimo (GIII). Aumento 107X. F - Detalhe do epitélio (GIII). Aumento 428X. Seta longa-tecido conjuntivo; Seta curta - Estereocílios; Cabeça de seta- lâmina basal; DE - Ducto epididimário; ES - Espermatozoides; EP - Epitélio pseudo-estratificado colunar. Coloração H.E.

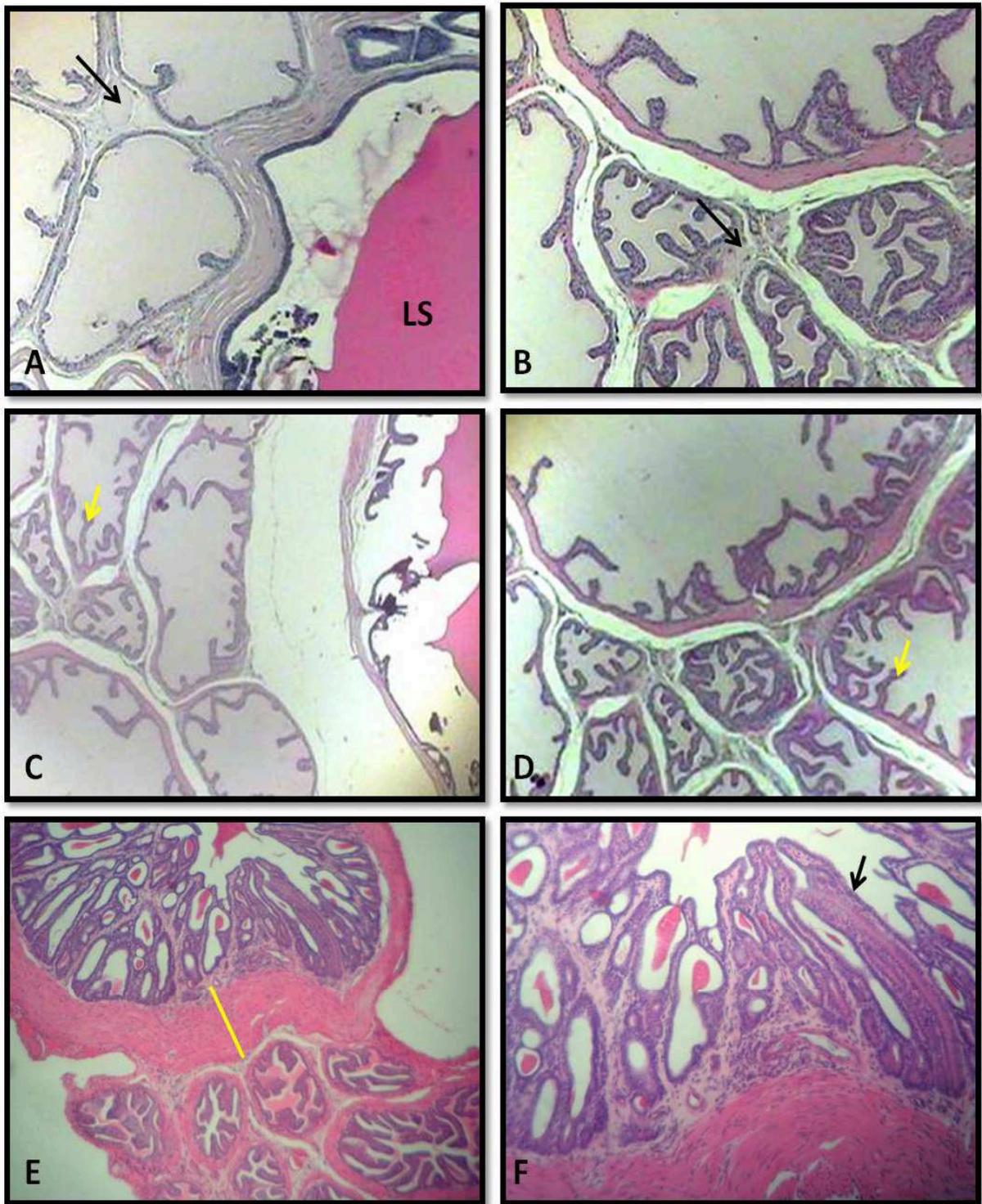


Figura 4: Fotomicrografia dos cortes de vesículas seminais dos animais dos grupos experimentais. A - Vesícula seminal (GI). Aumento 107X. B - Detalhe da mucosa (GI). Aumento 428X. C - Vesícula seminal (GII). Aumento 107X. D - Lâmina própria (GII). Aumento 428X. E - Vesícula seminal (GIII). Aumento 107X. F - Detalhe do epitélio e camada muscular (GIII). Aumento 428X. Seta longa - lâmina própria; Seta amarela: pregas da mucosa; Seta curta: prolongamentos do epitélio; LS - Líquido seminal; Barra amarela - Capa média muscular. Coloração H.E.

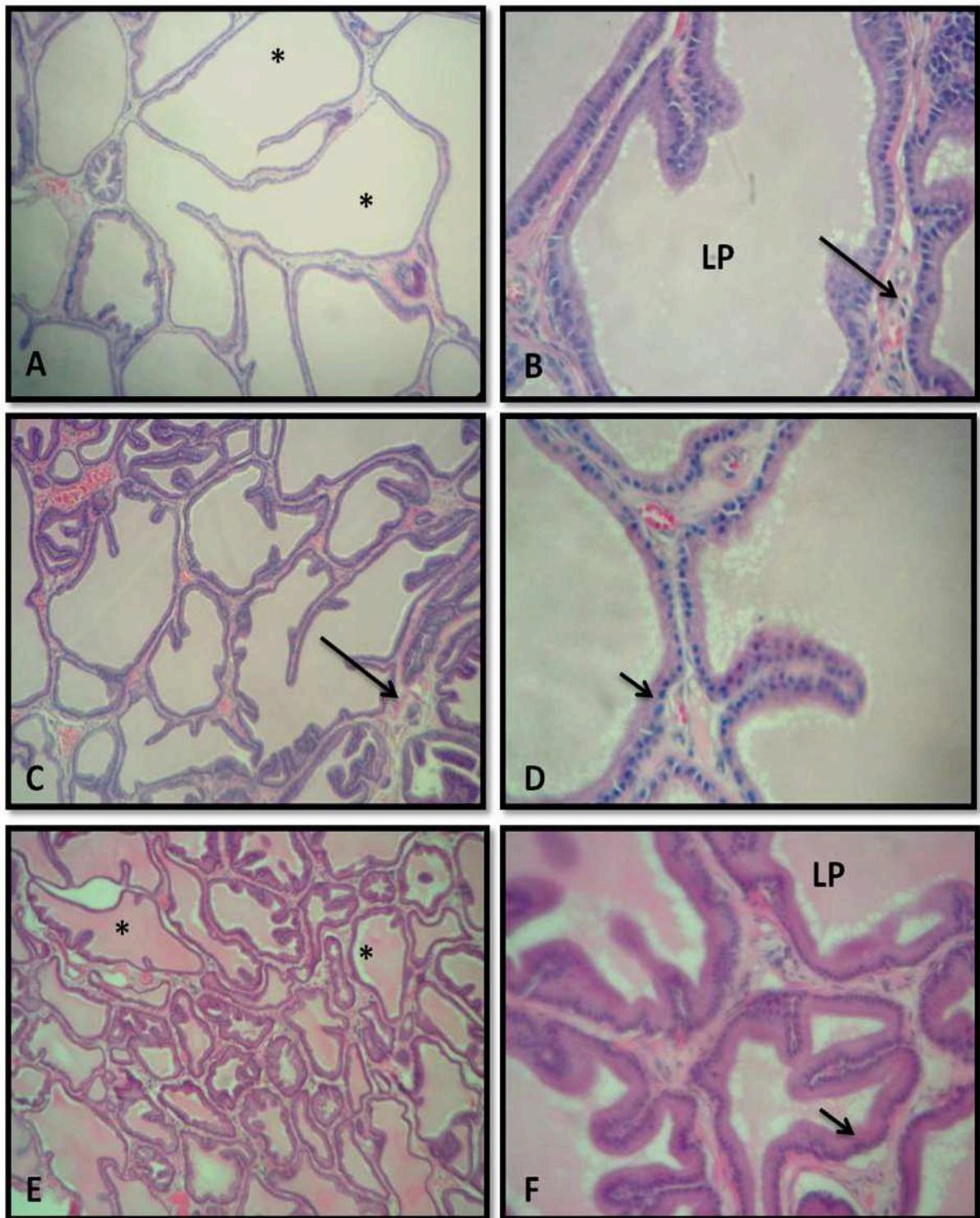


Figura 5: Fotomicrografia dos cortes da região periférica da próstata dos animais dos grupos experimentais. A - Próstata (GI). Aumento 42X. B - Detalhe das glândulas túbulo-alveolares (GI). Aumento 107X. C - Próstata (GII). Aumento 42X. D - Detalhe do epitélio glandular (GII). Aumento 107X. E - Glândulas túbulo-alveolares (GIII). Aumento 42X. F - Detalhe do epitélio glandular (GIII). Aumento 107X. Seta longa - Estroma; Seta curta - epitélio glandular; LP - Líquido prostático; * - Glândulas túbulo-alveolares. Coloração H.E.

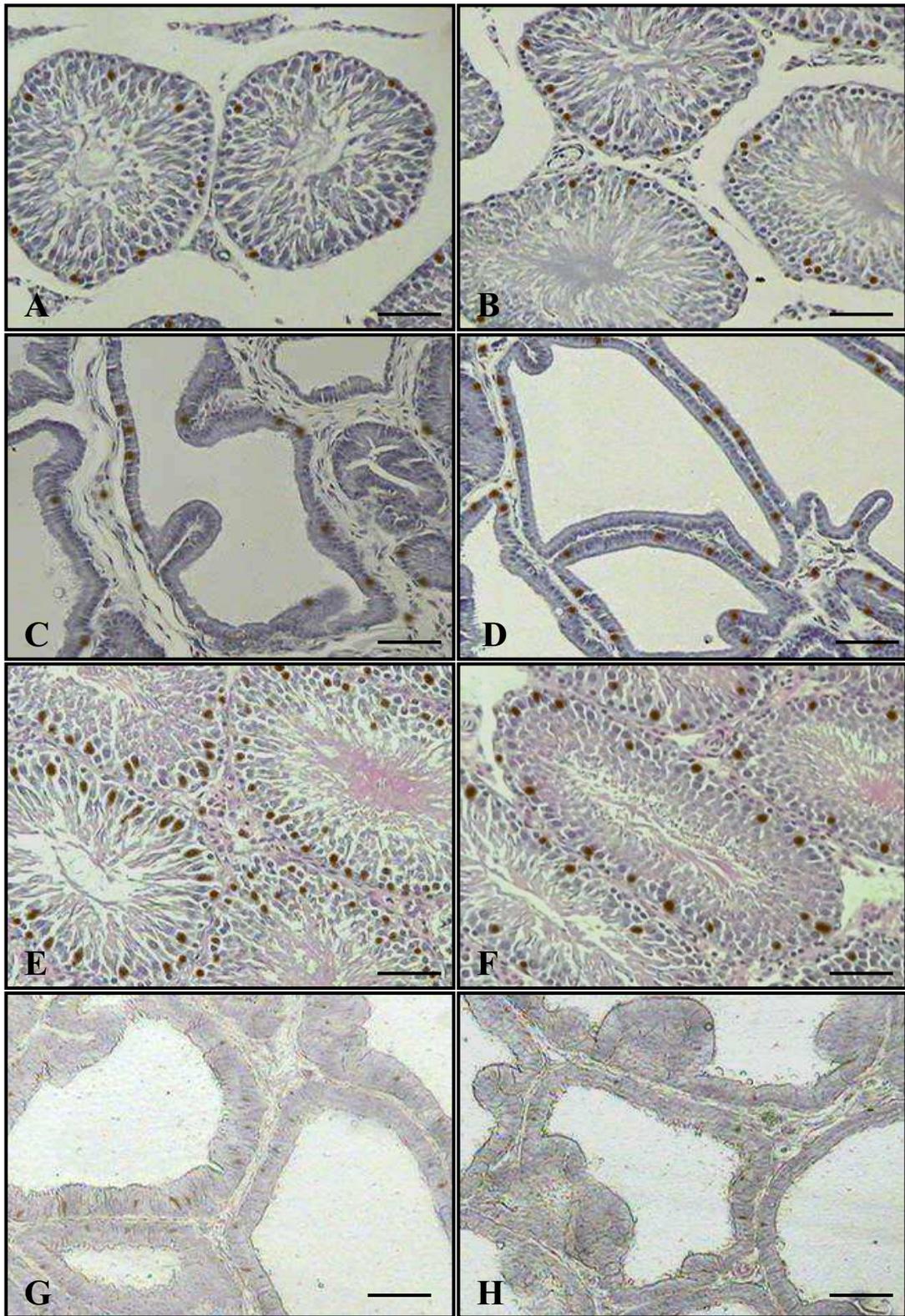


Figura 6: Apoptose teste de TUNEL: Testículo (A) controle e (B) estanozolol. Próstata (C) controle e (D) estanozolol. Proliferação celular teste Ki-67: Testículo (E) controle e (F) estanozolol. Próstata (G) controle e (H) estanozolol. Barras = 100 μ m.

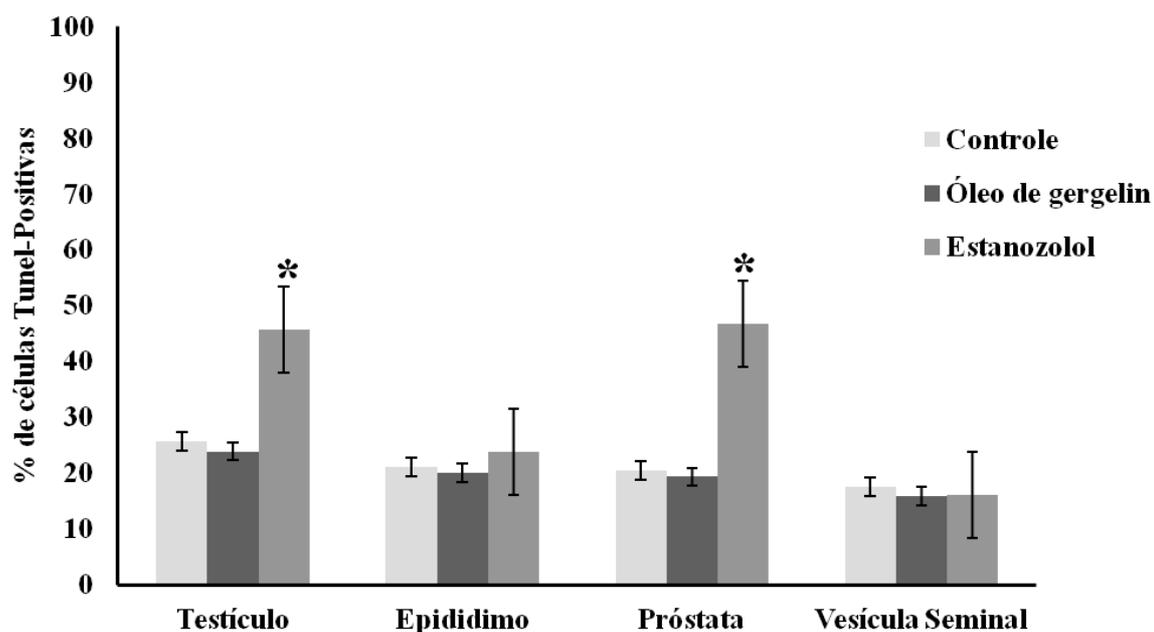


Figura 7: Gráfico do Índice apoptótico (IA) nos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (*P<0,05).

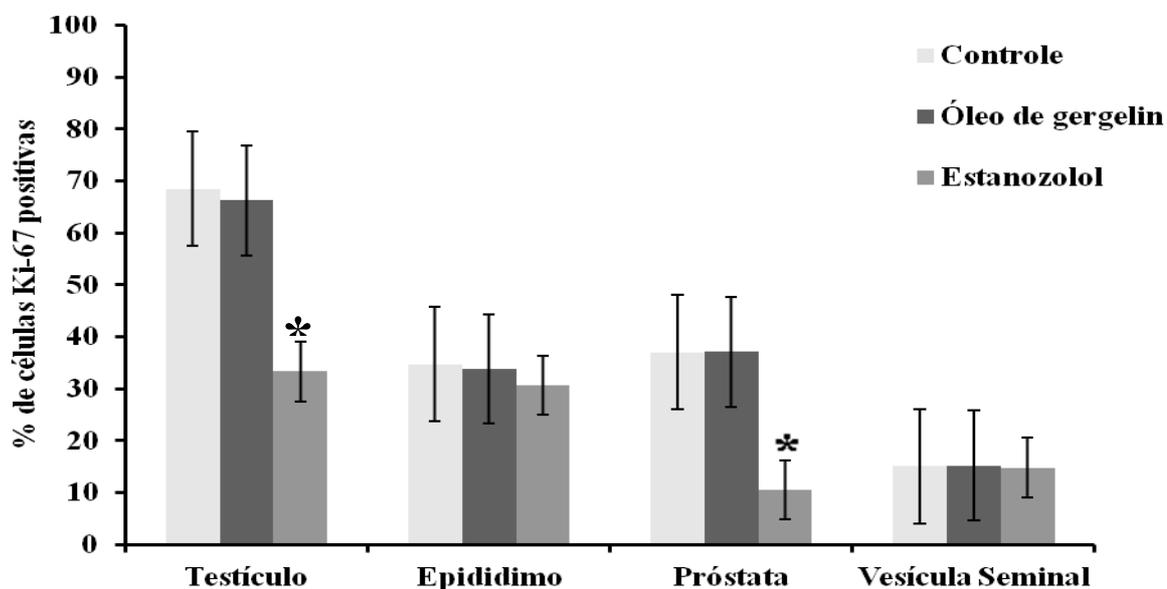


Figura 8: Gráfico do Índice de proliferação celular (IPC) nos órgãos dos animais dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (*P<0,05).

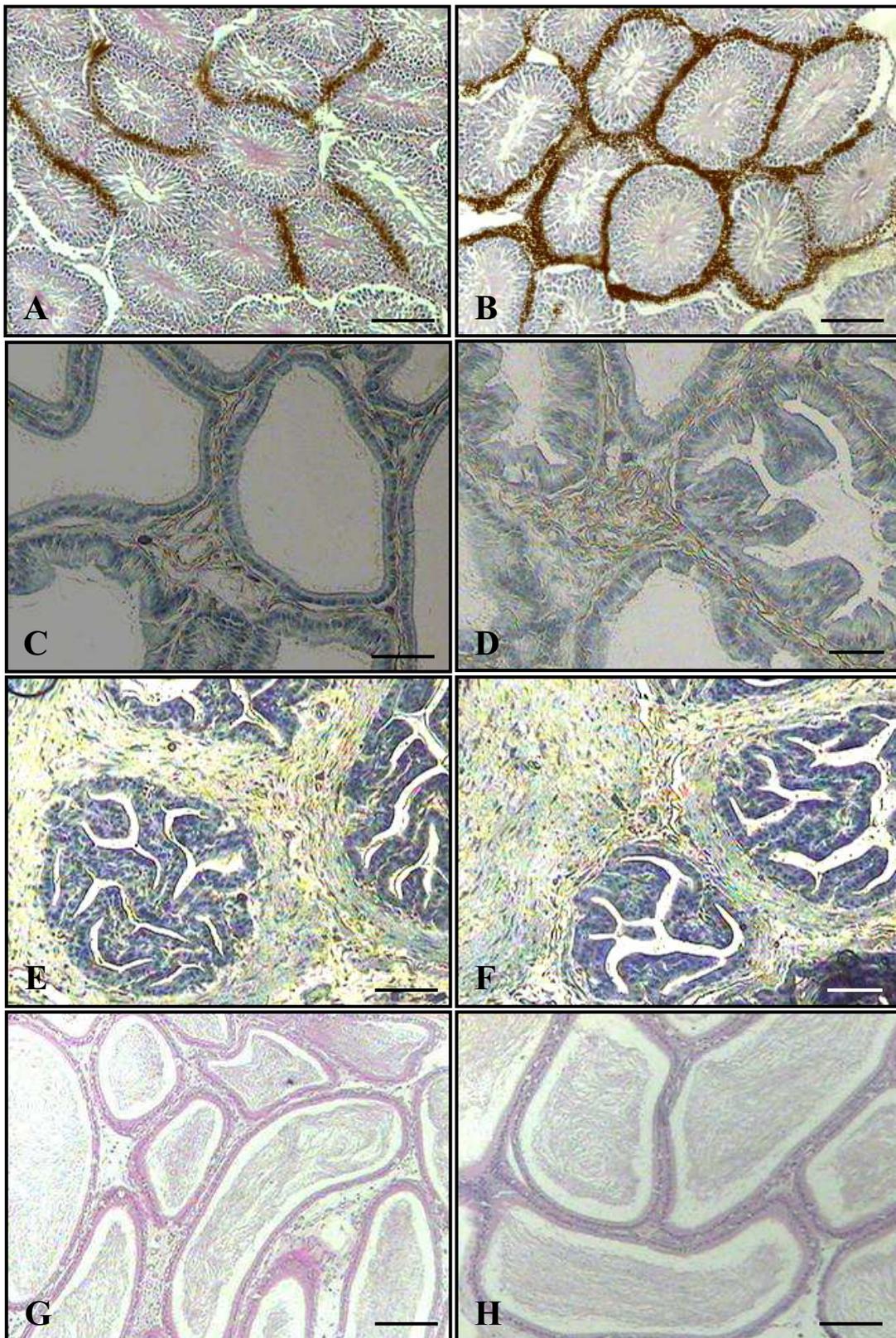


Figura 9: Imunomarcção com VEGF - A: Testículo (A) controle e (B) estanozolol. Próstata (C) controle e (D) estanozolol. Vesícula seminal (E) controle e (F) estanozolol. Epidídimo (G) controle e (H) estanozolol. Barras = 100µm.

4. Discussão

Androgênios endógenos são responsáveis pelo desenvolvimento sexual no sexo masculino, incluindo a maturação e manutenção dos testículos, próstata, vesícula seminal e epidídimo (Barceloux; Palmer, 2013). Porém, o uso abusivo de EAA pode levar a diversas alterações no corpo, inclusive no sistema genital masculino (Payne; Kotwinski; Montgomery, 2004; Pereira-Junior et al., 2006).

No presente estudo, foi constatada a redução significativa dos pesos e do índice organossomático, alterações histológicas e imunohistoquímicas n os órgãos estudados. Embora a literatura relate que o estanozolol seja um dos esteroides artificiais mais utilizados dentre os atletas por ser pouco androgênio e moderadamente anabólico, promovendo poucos efeitos colaterais (Guimarães Neto, 2003), os nossos resultados mostraram que a sua utilização contínua de doses suprafisiológicas, pode levar a efeitos semelhantes a outros EAA, os quais interferem no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal causando supressão hormonal (gonadotrofinas, testosterona, etc) e consequentemente redução ou atrofia dos órgãos hormônios-dependentes do aparelho reprodutor masculino (Mcintyre; Porter; Henderson, 2002; Noorafshan; Karbalay-Doust; Ardekani, 2005; O'sullivan et al., 2000; Shokri et al., 2009; Oda; El-Ashmawy 2012; Vargas et al., 2013). A redução do IO pode comprometer as funções do aparelho reprodutor masculino, visto que este reflete a relação dos órgãos com a massa corporal fornecendo informações sobre alterações no estado nutricional e energético ou dos efeitos tóxicos de uma substância em órgãos (Maxwell; Dutta, 2005).

Os andrógenos endógenos atuam sobre diferentes órgãos-alvo dentro do trato reprodutivo masculino para estimular o seu desenvolvimento exercendo efeito agonista sobre a proliferação e antagonista sobre a morte celular programada, para manter a estrutura e

função dos órgãos na fase adulta. A sua inibição pelos EAA provoca regressão desses órgãos via apoptose. No entanto, nem todos os órgãos do aparelho reprodutor são igualmente sensíveis à ausência de andrógenos endógenos (Tsuji et al., 1998). As análises do IA e IPC mostraram que apenas os testículos e próstata apresentaram resultados significativos, caracterizados pelo aumento da apoptose e redução da proliferação celular. Estudos reportam que doses suprafisiológicas de EAA provocam diminuição, por apoptose, do número de camadas de células germinativas nos testículos, e das células epiteliais da próstata, desregulando a síntese do líquido prostático, processo este diretamente associado ao estresse oxidativo (Sinowatz et al., 1995; Kiess; Gallaher, 1998; Giampietri et al., 2005; Shokri et al., 2009). Pey et al. (2003) ao submeter ratos à altas doses de estanozolol observou que este induziu o estresse oxidativo no fígado destes animais. Portanto, sugere-se que o estanozolol pode afetar o sistema antioxidante testicular e prostático, induzindo o estresse oxidativo que pode ser uma causa de infertilidade masculina.

Embora o epidídimo e vesículas seminais não tenham apresentado diferenças significativas nos índices apoptótico e de proliferação celular o estanozolol promoveu alterações histológicas que podem sugerir efeitos tóxicos nesses órgãos. As vacuolizações encontradas no epitélio do epidídimo podem ser consequência da degeneração vacuolar, a qual é induzida pela privação de andrógenos endógenos, uma vez que estes são considerados essenciais para a manutenção estrutural do epitélio epididimário (Goyal; Hutto; Maloney, 1994). Já em relação a aparente atrofia das vesículas seminais estudos demonstraram que em animais castrados ocorrem alterações morfológicas e atrofia destas glândulas. No entanto após dez dias de reposição com testosterona, foi verificada reestruturação destes órgãos e o reestabelecimento de suas funções secretoras e recuperação do peso, arquitetura e população de células epiteliais (Higgins; Burchell, 1978; Lee, 1996; Justulin et al., 2006).

Com relação à imunomarcação para a expressão do VEGF-A, houve maior intensidade no tecido conjuntivo peritubular nos testículos e no estroma da próstata dos animais tratados com estanozolol. Nos testículos as células de Leydig são responsáveis pela produção de VEGF-A, desempenhando um papel importante na regulação da angiogênese e da permeabilidade vascular local (Ludwikowski; González, 2013). Entretanto, a utilização de altas doses de EAA, induzem as células de Leydig a síntese desse fator angiogênico, aumentando assim, o risco de interrupção da espermatogênese (Sone; Deo; Kumagai, 2000) Ou Desenvolvimento De Tumor Testicular (Chimento et al., 2011). Como a microcirculação testicular é considerada fundamental na regulação tanto da gametogênese quanto da esteroidogênese (Korpelainen et al., 1998), a administração do estanozolol pode interferir nesses processos resultando na infertilidade.

A elevação sanguínea da concentração do fator de crescimento endotelial vascular, provocada por andrógenos anabolizantes, reflete sua produção prostática, tornando este um marcador tumoral potencialmente interessante, pois a expressão em grandes quantidades desse fator no epitélio e sua disseminação para o estroma estimula o aumento na proliferação de células endoteliais e a neovascularização, fatores necessários para a continuação crescimento da malignidade (Eisermann et al., 2013). Entretanto, o aumento da expressão deste fator no estroma tem sido associado aos casos de hiperplasia benigna prostática (HBP) (Walsh et al., 2002; Botelho; Pina; Lunet, 2010). Assim, o estanozolol, de alguma forma, parece interferir na expressão do VEGF-A na próstata que pode atuar diferentemente nos na indução da HBP ou do câncer.

5. Conclusão

Muitos efeitos adversos têm sido associados com o abuso de diversos EAA, incluindo distúrbios do trato urogenital. Nós mostramos que a administração de 5mg/Kg de estanozolol, cinco vezes por semana, durante quatro semanas, promove alterações de intensidades diferentes nos testículos epidídimo, próstata e vesículas seminais de ratos adultos, semelhantemente a outros esteroides anabolizantes, que pode comprometer a fertilidade. Isso induz a necessidade de mais estudos para a melhor compreensão do mecanismo de atuação do estanozolol na fisiologia reprodutiva.

Referências

Barceloux, D. G.; Palmer, R. B. Anabolic-Androgenic Steroids. **Disease-a-Month.**, v. 59, n. 6, p. 226-248, 2013.

Botelho, F.; Pina, F.; Lunet, N. VEGF and prostatic cancer: a systematic review. **Eur J Cancer Prev.**, v. 19, n. 5, p. 385-392, 2010.

Burcombe, R.; Wilson, G. D.; Dowsett, M.; Khan, I.; Richman, P. I.; Daley, F.; Detre, S.; Makris, A. Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 8, p. 31-40, 2006.

Chimento, A.; Sirianni, R.; Zolea, F.; Luca, A.; Lanzino, M.; Catalano, S.; Andò, S.; Pezzi, V. Nandrolone and stanozolol induce leydig cell tumor proliferation through an estrogen-dependent mechanism involving igf-i system. **J. Cell. Phys.** v. 227, n. 5, p. 2079-2088, 2011.

Dohle, G. R.; Smith, M.; Weber, R. F. A. Androgens and male fertility. **World Journal of Urology**, v. 21, n. 5, p. 341-345, 2003.

Eisermann, K., Broderick, C. J., Bazarov, A., Moazam, M. M., Fraizer¹, G. C. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. **Mol. Cancer**, v. 12, n. 7, p. 1-12, 2013.

Evans, N.A. Currents concepts in anabolic-androgenic steroids. **Am. J. Sports Med.**, v. 32, n. 2, p. 534-542, 2004.

Frizon, F.; Macedo, S. M. D.; Yonamine, M. Uso de esteroides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo/RS. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n.3, p. 227-232, 2006.

Giampietri, C.; Petrunaro, S.; Coluccia, P.; D'alessio, A.; Starace, D.; Riccioli, A.; Padula, F.; Palombi, F.; Ziparo, E.; Filippini, A.; Cesaris, P. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. **Contraception**. v. 72, n. 4, p. 298-302, 2005.

Guimarães Neto, W. M. **Musculação: anabolismo total: nutrição, treinamento, uso de esteróides anabólicos e outros ergogênicos**. 6. ed. São Paulo: Phorte, 2003. 171 p.

Hartgens, F.; Kuipers, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med.**, v. 34, n.8, p. 513-54, 2004.

Hoffman, J.R.; Ratamess, N.A. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? **J. Sports. Sci. Med.**, v. 5, n. 2, p. 182-193, 2006.

Hoseini, L.; Roozbeh, J.; Sagheb, M.; Karbalay-Doust, S.; Noorafshan, A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. **Micron.**, v. 40, n. 2, p. 226-30, 2009.

Iriart, J. A.; Andrade, T. M. Musculação. Uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 18, n. 5, p.1379-1387, 2002.

Janjic, M. M.; Stojkov, N. J.; Andric, S. A.; Kostic, T. S. Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following in vivo exposure. **Reprod. Toxicol.**, v. 34, n. 4, p. 686-93, 2012.

Justulin, L. A.; Ureshino, R. P.; Zanoni, M.; Felisbino, S. L. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. **Cell Biol. Int.**, v. 30, n. 4, p. 354-364, 2006.

Kanayama, G.; Hudson, J. I.; Pope, H. G. Jr. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? **Drug. Alcohol. Depend.**, v. 98, n. 1-2, p. 1-12, 2008.

Kanayama, G.; Pope, H. G. Jr. Illicit use of androgens and other hormones: Recent advances. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 19, n. 3, p. 211–219, 2012.

Karbalay-Doust, S.; Noorafshan, A.; Ardekani, F.; Mirkhani, H. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. **Asian Journal of Andrology**. v. 9, n. 2, p. 235-239, 2007.

Kiess, W.; Gallaher, B. Hormonal control of programmed cell death/ apoptosis. **Eur. J. Endocrinol.** v, 138, n. 5, p. 482-491, 1998.

Korpelainen, E. I.; Kárkkäinen, M. J.; Tenhunen, A.; Lakso, M.; Rauvala, H.; Vierula, M.; Parvinen, M.; Alitalo, K. A superexpressão de VEGF no testículo e epidídimo provoca infertilidade em ratos transgênicos: Evidência de Metas não endoteliais para VEGF. **JCB**. v. 143, n. 6, p. 1705-1712, 1998.

Labre, M. P. Adolescent boys and the muscular male body ideal. **Journal of Adolescent Health**. v. 30, n. 4, p. 233-242, 2002.

Lee, C. Role of androgen in prostate growth and regression: stromalepithelial interaction. **Prostate**. v. 6, p. 52-56. 1996.

Losa, M.; Barzaghi, R. L. A.; Mortini, P.; Franzin, A.; Mangili, F.; Terreni, M. R.; Giovanelli, M. Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors. **Am. J. Pathol.**, v. 156, n. 1, p. 245-251, 2000.

- Ludwikowski, B.; González, R. The controversy regarding the need for hormonal treatment in boys with unilateral cryptorchidism goes on: A review of the literature. **Eur. J. Pediatr.**, v. 172, n. 1, p. 5-8, 2013.
- Maior, A. S.; Bernasconi, A.; Sanches, J. F.; Simão, R.; Menezes, P.; Miranda, H.; Nascimento, J. H. M. Uso de esteroides anabólicos em duas cidades do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Prescr. Fisiol. Exerc.**, v. 3, n. 18, p. 580-591, 2009.
- Maravelias, C.; Dona, A.; Stefanidou, M.; Spiliopoulou, C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes A constant threat. **Toxicol. Lett.**, v. 158, n. 3, p. 167-175, 2005.
- Marques, M. A.; Pereira, H. M. G.; Aquino Neto, F. R. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Ver. Bras. Med. Esporte.**, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2003.
- Maxwell, L. B.; Dutta, H. M. Diacinnon induced endocrine disruption in sole gill sun fish *Lepomis macrochirus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, n.1, p. 21-27, 2005.
- Mcintyre, K. L.; Porter, D. M.; Henderson, L. P. Anabolic androgenic steroids induce age-, sex-, and dose-dependent changes in GABA(A) receptor subunit mRNAs in the mouse forebrain. **Neuropharmacology**. v. 43, n. 4, p. 634-645, 2002.
- Noorafshan, A.; Karbalay-Doust, S.; Ardekani, F. M. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. **APMIS**. v. 113, n. 2, p. 122-125, 2005.
- O'sullivan, A. J.; Kennedy, M. C.; Casey, J. H.; Day, R. O.; Corrigan, B.; Wodak, A. D. Anabolic-androgenic steroids: medical assessment of present, past and potential users. **Med. J. Aust.**, v. 173, n. 6, p. 323-327, 2000.

Oda, S. S.; El-Ashmawy, I. M. Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. **Int. J. Exp. Pathol.** v. 93, n. 3, p. 172-178, 2012.

Oda, S. S.; El-Ashmawy, I. M.. Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. **International Journal of Experimental Pathology.** v. 93, n. 3, p. 172-178, 2012.

Parkinson, A. B.; Evans, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 38, p. 644-51, 2006.

Payne, J. R.; Kotwinski, P. J.; Montgomery, H. E. Cardiac effects of anabolic steroids. **Heart.**, v. 90, n. 5 , p. 473-475, 2004.

Pereira-Junior, P. P.; Chaves, E. A.; Costa-E-Souza, R. H.; Masuda, M. O.; Carvalho, A. C. C.; Nascimento, J. H. M. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. **J. Eur. Phys.**, v. 96, n. 5, p. 487-494, 2006.

Pey, A.; Saborido, A.; Blazquez, I.; Delgado, J.; Megias, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 87, n. 4-5, p. 269-277, 2003.

Russo, R. C. T. Imagem corporal: construção através da cultura do belo. **Movimento & Percepção.** v. 5, n. 6, p. 80-90, 2005.

Santos, A. F.; Mendonça, P. M. H.; Santos, L. A.; Silva, N. F.; Tavares, J. K. L. Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE). **Psicol. estud.**, v. 11, n. 2, p. 371-380, 2006.

Shokri, S.; Aiteken, R. J.; Abdolvahhabi, M.; Abolhasani, F.; Ghasemi, F. M.; Kashani, I.; Ejtemaeimehr, S.; Ahmadian, S.; Minaei, B.; Naraghi, M. A.; Barabarestani, M. Exercise and

supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells.

Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. v. 106, n. 4, p. 324-330, 2009.

Silva, L. S. M. F.; Moureau, R. L. M. Uso de esteroides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.

Sinowatz, F.; Amselgruber, W.; Plendl, J.; Kolle, S.; Neumuller, C.; Boos, G. Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. **Microsc. Res. Tech.** v. 30, n. 5, p. 282-292, 1995.

Sone, H.; Deo, B. K.; Kumagai, A. K. Enhancement of glucose transport by vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 4, n. 7, p.1876-1884, 2000.

Tsuji, M.; Terada, N.; Sugihara, A.; Tsujimura, T.; Donjacour, A. A.; Cunha, G. R. Later onset of apoptosis in the bulbourethral glands after castration compared to that in the seminal vesicles. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 67, n. 2, p. 113-118, 1998.

Tucci, P.; Morgese, M. G.; Colaianna, M.; Zotti, M.; Schiavone, S.; Cuomo, V.; Trabace, L. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. **Steroids.**, v. 77, n. 3, p. 269-75, 2012.

Vargas, R. A.; Oliveira, L. P.; Frankenfeld, S., Souza, D. B.; Costa, W. S.; Favorito, L. A.; Sampaio, F. J. B. The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 39, n. 5, p. 675-682, 2013.

Walsh, K.; Sriprasad, S.; Hopster, D.; Codd, J.; Mulvin, D. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) in prostate disease. **Prostate Cancer . Prostatic Dis.**, v. 5, n. 2, p. 119–122, 2002.

Williamson, A. E.; Cone, L. A.; Huard, G. S. Spontaneous necrosis of the skin associated with cryofibrinogenemia, cryoglobulinemia, and homocystinuria. **Annals of Vascular Surgery**. v. 10, n. 4, p. 365-369, 1995.

Wu, X.; Cheng, B.; Cai, Z. D.; Lou, L. M. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. **Cancer Cell Int.**, v. 13, n. 56, p. 1-4, 2013.