



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

LAÍS CAROLINE DA SILVA SANTOS

**EFEITO DA NANDROLONA SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DO ÚTERO E OVÁRIOS DE RATAS**

**RECIFE
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

LAÍS CAROLINE DA SILVA SANTOS

**“EFEITO DA NANDROLONA SOBRE A MORFOFISIOLOGIA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DO ÚTERO E OVÁRIOS DE RATAS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Orientador:

Prof^a. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

RECIFE

2018

LAÍS CAROLINE DA SILVA SANTOS

**“EFEITO DA NANDROLONA SOBRE A MORFOFISIOLOGIA
IMUNOHISTOQUÍMICA DO ÚTERO E OVÁRIOS DE RATAS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - (Orientadora)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Laise de Souza Elias – CAV-UFPE

Prof. Dr. Edson João da Silva - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta, e me mostrar que caminhar junto a ele é a melhor solução!

A meus pais, Jorge e Maria do Carmo, por terem me dado apoio nos momentos mais difíceis, sem eles não conseguiria nada nessa vida, principalmente por sempre mostrar que o estudo é A MELHOR, solução. Dedico esse trabalho a eles. Obrigada pelo amor incondicional, amo vocês!

Não poderia deixar de agradecer, a todos os meus amigos em especial, Vladia, Nathaly, Jaqueline e Thais por todo o apoio desde a seleção até a defesa, foram elas que me aguentaram no momento de choro, desespero sempre estando ao meu lado até nos momentos de estresse, amo vocês demais e agradeço todos os dias por Deus ter colocado vocês no meu caminho, não consigo nem expressar o que sinto por vocês vai além do amor. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A todos do Laboratório de Histologia que direta ou indiretamente, ajudaram para concretização deste trabalho, em especial Carolline, Clovis e Nane (Glaucilane) que sem eles muitas metodologias deste trabalho seriam mais demoradas, e os feriados no laboratório seriam mais longos. Obrigada do fundo do coração.

Agradeço principalmente a minha orientadora Professora Valeria Wanderley Teixeira, por toda paciência e dedicação que sempre teve comigo, para que a confecção desse trabalho ficasse o mais perfeito possível, até pelas puxadas de orelha. Obrigada espero que um dia eu seja metade do que a senhora é! Me fez enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação. Ao meu co-orientador Professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira que também colaborou para a concretização deste trabalho.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, nos momentos de desespero e nos momentos de diversão, especialmente a Welligton, Gisele, Kétsia, Givanildo e Nivaldo que se tornaram verdadeiras amigos, tornaram mais leve meu trabalho e saíram de amigos de turma para

amigos da vida. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês! E saber que vamos dividir mais momentos deste agora no doutorado.

Agradeço, também, a CAPES pelo apoio financeiro, que me proporcionou realizar os procedimentos do presente trabalho. A Universidade Federal Rural de Pernambuco, o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela oportunidade e concessão do local para realização deste trabalho.

Para finalizar a todos que passaram por mim nesses dois anos de correria e muito aprendizado, ninguém vence sozinho, a vitória compartilhada é mais glorificante.

Querer vencer significa já ter percorrido metade do caminho. Obrigada a TODOS!!!

RESUMO

A alta incidência do uso de esteroides anabólicos nas últimas décadas, ultrapassaram os meios esportivos/competições, e passaram a ser utilizados também por atletas recreacionais e mulheres que o utilizam para fins estéticos, visando o aumento de massa magra e redução de gordura subcutânea. Estudos, no entanto, têm demonstrado que a administração desses anabolizantes tem resultado em efeitos adversos em vários sistemas fisiológicos. Mediante a falta de pesquisas sobre alterações nos órgãos reprodutivos feminino e seu efeito sobre citocinas pró-inflamatórias, esta pesquisa investigou possíveis alterações ou efeitos provocados pelo uso suprafisiológico da nandrolona sobre a morfofisiologia e imunohistoquímica do útero e ovários, bem como seu efeito na fertilidade de ratas Wistar. Foram utilizadas 30 ratas albinas da linhagem *wistar*, com 60 dias de idade e peso aproximadamente de $\pm 190\text{g}$, divididas em três grupos experimentais: controle (C), controle veículo (CV) e tratamento-esteróide (TE), contendo dez animais cada. Os animais do grupo TE foram submetidos a injeções subcutâneas, 5 dias/semana, por 30 dias, na concentração de 5 mg/kg de nandrolona em 1 mL/kg de propilenoglicol. Os animais do grupo controle (C) e controle veículo (CV) foram submetidos às mesmas condições do grupo TE, exceto pela ausência do esteróide. Foi analisada a morfologia do útero e ovários de cinco fêmeas de cada grupo pela técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E). Foi avaliado também o índice organossomático, níveis hormonais (estrôgeno e progesterona), a ciclicidade estral e imunohistoquímica (TNF α , IL6, VEGF e apoptose). As ratas restantes desses grupos foram utilizadas para avaliação da fertilidade. Os resultados mostraram que houve redução do índice organossomático nos ovários e aumento deste fator no útero, bem como aumento do peso corpóreo das ratas submetidas apenas ao esteróide. Essas mesmas ratas apresentaram um quadro de estro permanente, redução dos níveis séricos de estrógenos e progesterona. A análise morfológica revelou ainda ovários sem corpos lúteos, aumento de folículos terciários, e no útero redução significativa do lúmen e glândulas endometriais mais desenvolvidas. A quantificação da expressão para as citocinas TNF α e IL6 revelou aumento significativo nos ovários e útero das ratas tratadas com esteróide. Com relação

ao VEGF houve aumento de sua expressão nos ovários das ratas tratadas com o esteróide, entretanto este fator reduziu no útero. Os ovários e úteros dessas ratas apresentaram aumento significativo do índice apoptótico. Assim conclui-se que os efeitos adversos da nandrolona no aparelho reprodutor feminino podem está relacionados à sua interferência na regulação das citocinas pró-inflamatórias e no processo apoptótico normal.

Palavras-chave: Anabolizantes, ratas, reprodução, imunohistoquímica, níveis hormonal, ciclicidade estral, índice organossomático.

ABSTRACT

The high incidence of the use of anabolic steroids in the last decades, have surpassed the sporting resources / competitions, and have been used by recreational athletes and women who use it for aesthetic purposes, aiming at increasing lean mass and reducing subcutaneous fat. Studies, however, have shown that the administration of these anabolics has resulted in adverse effects on various physiological systems. Due to the lack of research on alterations in the female reproductive organs and their effect on proinflammatory cytokines, this research investigated possible alterations or effects caused by the supraphysiological use of nandrolone on the morphology and immunohistochemistry of the uterus and ovaries, as well as its effect on the fertility of Wistar rats. Thirty albino rats of the wistar line, 60 days old and weighing approximately $\pm 190\text{g}$, were divided into three experimental groups: control (C), control vehicle (CV) and treatment-steroid (TE), containing ten animals each. The animals of the TE group underwent subcutaneous injections, 5 days / week, for 30 days at the concentration of 5 mg / kg of nandrolone in 1 mL / kg of propylene glycol. The animals of the control group (C) and control vehicle (CV) were submitted to the same conditions of the TE group, except for the absence of the steroid. The morphology of the uterus and ovaries of five females of each group was analyzed by the hematoxylin-Eosin staining technique (H.E). The organosomal index, hormone levels (estrogen and progesterone), estral and immunohistochemical cyclicity (TNF α , IL6, VEGF and apoptosis). The remaining rats of these groups were used for fertility evaluation. The results showed that there was a reduction of the organosomal index in the ovaries and an increase of this factor in the uterus, as well as an increase in the body weight of rats submitted to the steroid alone. These same rats presented a permanent estrous condition, reduction of serum levels of estrogens and progesterone. Morphological analysis also revealed ovaries without corpora lutea, enlargement of tertiary follicles, and in the uterus significant reduction of lumen and more developed endometrial glands. Quantification of the expression for cytokines TNF α and IL6 revealed significant increase in the ovaries and uterus of the steroid treated rats. Regarding VEGF, there was an increase in its expression in the ovaries of rats treated with the steroid, however this factor

decreased in the uterus. The ovaries and uterus of these rats showed a significant increase in the apoptotic index. Thus, it is concluded that the adverse effects of nandrolone in the female reproductive tract may be related to its interference in the regulation of pro-inflammatory cytokines and the normal apoptotic process.

Key words: Anabolics, rats, reproduction, immunohistochemistry, hormonal levels, estrous cyclicity, organosomal index.

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Esteróides anabólicos androgênicos.....	11
2.2. Mecanismo de ação dos EAAs.....	15
2.3. Decanoato de nandrolona.....	16
2.4. Efeitos dos EAAs no sistema reprodutor e ciclo estral.....	18
3. REFERÊNCIAS.....	22
II	
Estudo imunohistoquímico e histofisiológico do uso prolongado de nandrolona sobre órgãos reprodutivos e fertilidade.....	27
Resumo.....	28
Introdução.....	29
Material e métodos.....	31
Resultados.....	35
Conclusão.....	41
Referências.....	41

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1. Conversão da testosterona a di-hidrotestosterona (DHT) e estradiol. A testosterona é irreversivelmente convertida pela enzima 5^a-redutase a DHT, que se liga com maior afinidade ao receptor de androgênio (RA) ou pela aromatase em estradiol que se liga ao receptor do estrogênio (RE). Modificado de Kicman (2008).....13

Figura 2: Mecanismo de ação dos esteroides anabólicos androgênicos.....16

Figura 3. Estrutura molecular na nandrolona. Fonte SENOS, (2013).....18

Figura 4. Variações cíclicas das gonadotrofinas hipofisárias, estrógeno e progesterona durante o ciclo reprodutivo humano (A) e do rato (B). LH: Hormônio Luteinizante; FSH: Hormônio Folículo Estimulante. EMANUELE; WEZEMAN; EMANUELE, 2002)..... 21

CAPITULO II

Figura 1. Fases do ciclo estral. A – Proestro, B – Estro, C – Metaestro e D – Diestro.....37

Figura 2. Índice organossomático do ovário. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....53

Figura 3. Índice organossomático do útero. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....54

Figura 4. Medias do percentual das fases do ciclo estral das fêmeas dos grupos experimentais. Médias seguidas por letras diferentes, dentro das fases,

diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....54

Figura 5: Ovários das ratas: (A) e (B) Grupo controle: Notar grande quantidade de corpos lúteos (CI) e vários folículos ovarianos (setas longas), além da presença de vários vasos sanguíneos (seta curta). (C) e (D) grupo controle veículo apresentando semelhante ao grupo controle. (E) e (F) grupo tratamento esteroide presença de inúmeros folículos terciários (seta branca), ausência de corpos lúteos e presença de vasos sanguíneos na região medular (seta curta). Coloração H.E.....55

Figura 6: Útero das ratas: (A) e (B) grupo controle; (C) e (D) grupo controle veículo: Notar útero sem alteração histológica. Lúmen uterino (seta preta), estroma com presença de glândulas endometriais (seta branca). (E) e (F) grupo tratamento esteroide: redução do lúmen uterino (seta preta) e glândulas endometriais dilatadas (seta branca). Coloração H.E.....56

Figura 7. Níveis séricos do estrógeno nas ratas dos grupos experimentais. A: 60 dias, B: 70 dias, C: 80 dias e D: 90 dias. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....57

Figura 8. Níveis séricos de progesterona nas ratas dos grupos experimentais. A: 60 dias, B: 70 dias, C: 80 dias e D: 90 dias. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....58

Figura 9. Quantificação da expressão do $TNF\alpha$ nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....59

Figura 10. Quantificação da expressão do $TNF\alpha$ no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....60

Figura 11. Quantificação da expressão do IL6 experimentais no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)..... 61

Figura 12. Quantificação da expressão do IL-6 no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....62

Figura 13. Quantificação da expressão do VEGF nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....63

Figura 14. Quantificação da expressão do VEGF no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....64

Figura 15. Índice apoptótico nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....65

Figura 16. Índice apoptótico no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....66

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Efeitos androgênicos e anabólicos dos EAA descrito por Ghaphery, 1995.....14

Tabela 2. Esteroides anabólicos mais consumidos segundo o NIDA (2001)....17

Figura 3. Estrutura molecular na nandrolona. Fonte SENOS, (2013).....19

CAPITULO II

Tabela 1. Média ($\pm$ desvio padrão) do peso das fêmeas e do útero e ovários.....53

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

Uma das facetas que tem caracterizado a sociedade de consumo é a crescente importância atribuída à aparência corporal. Mulheres têm se preocupado e dado maior atenção ao corpo, para a obtenção do parâmetro imposto pela sociedade, por meio da utilização de técnicas e cuidados voltados para o mesmo, investido em dietas, musculação e até mesmo cirurgias estéticas. Em paralelo ao culto ao corpo, estudos mostram que tem aumentado o número de pessoas que se encontram insatisfeitas com sua aparência física, aumentando o consumo de drogas/esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) conhecidas como "drogas da imagem corporal (IRIART; CHAVES; ORLEANS, 2009).

Os Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAAs) são drogas sintéticas, resultado do metabolismo do colesterol, produzidas pelo córtex da glândula adrenal, testículos e ovários (BARROS et al., 2014). Inicialmente foram desenvolvidos para aplicações clínicas, para o tratamento de doenças crônicas associadas ao estado catabólico em pacientes acometidos por: AIDS; doença pulmonar obstrutiva crônica; deficiência hepática ou renal; câncer; casos de queimadura; e recuperação pós-operatória (SHAHIDI, 2001; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; KICMAN, 2008). Porém nas últimas décadas verificou-se um uso dessas drogas para melhoramento físico e um aumento do consumo por mulheres que o utilizam para fins estéticos, visando o aumento de massa magra e redução de gordura subcutânea (POPE; KATZ, 2004).

Estes esteroides atuam principalmente na síntese proteica, agindo na célula da seguinte maneira, conseguem atravessar a membrana plasmática (MP) por possuírem um baixo peso molecular (SHUPPNIK, 1997), após atravessar a MP se liga a receptores citoplasmáticos formando um complexo denominado esteroide-receptor, este complexo por sua vez migra para o núcleo da célula e induz o DNA a sintetizar RNAm, que produzirá as proteínas (BAULIEU, 1975).

Entre os EAAs mais conhecidos destacamos o decanoato de nandrolona, também chamada de deca durabolin, cuja substância ativa é a Nandrolona (ND). Segundo Cunha et al. (2006) é um dos anabolizantes mais utilizados do mundo, devido ao seu moderado potencial androgênico e boa propriedade anabólica, provendo a hipertrofia muscular (DUTRA; PAGANI; RAGNINI, 2012). Sua substância

33 ativa é promotora do aumento da massa muscular, ganho de força e peso, e
34 consequentemente performance física (KOHLER; LAMBERT, 2002). Geralmente, os
35 EAAs são administrados em dose suprafisiológicas (FERMO et al., 2008), que são
36 de cinco a 29 vezes maiores do que as dose recomendada pela a substituição
37 hormonal (PERRY et al., 2005) ou podendo chegar a 100 vezes a aplicada para
38 tratamento terapêuticos (CLARK; FAST, 1996).

39 Estudos, no entanto, têm demonstrado que a administração de EAAs têm
40 resultado em efeitos adversos em vários sistemas fisiológicos (MARAVELIAS et al.,
41 2005; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; HOSEINI et al., 2009), levantando a hipótese
42 que os EAAs em doses elevadas sejam capazes de estimular a produção de várias
43 substâncias que podem exercer efeito negativo sobre os órgãos reprodutivos, bem
44 com os radicais livres e algumas citocinas como o Interferon gama, o Fator de
45 necrose tumoral alfa (TNF- α) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2011) e IL6 caracterizando
46 o processo inflamatório (KALFAS, 2001; PHILLIPS, 2005; ROZEN et al., 2007;
47 KOLAR et al., 2010).

48 Mediante a falta de pesquisas sobre alterações nos órgãos reprodutivos, pouco
49 se sabe sobre as modificações causadas por essa droga no aparelho reprodutor
50 feminino e seu efeito sobre citocinas pró-inflamatórias, pois pesquisa relevante
51 nessa área trata primordialmente sobre esteroides ligados ao sexo masculino.
52 Assim, este trabalho visou investigar possíveis alterações ou efeitos provocados
53 pelo uso suprafisiológico da nandrolona sobre a morfofisiologia e imunohistoquímica
54 do útero e ovários de ratas da linhagem *Wistar*.

56 2. REVISÃO DE LITERATURA

58 2.1. Esteroides anabólicos andrógenos

59 A busca por substâncias que melhoram o desempenho físico é mais antiga do
60 que se imagina. Antigamente os gregos faziam uso de cogumelos alucinógenos, já
61 em Roma, os gladiadores do Coliseu usavam estimulantes naturais. Índios da
62 América do Sul mascam folhas de coca como um estimulante natural e os
63 noruegueses Vikings comiam fungos para se manterem acordados e descansados

para as suas batalhas e conquistas. Na China, onde a historia documenta há mais de 2.700 a.c, o imperador da dinastia Cheng Shen-Nunge descreve o efeito estimulante de uma planta local chamada “machung”, utilizada por lutadores e desportistas chineses para dar mais animo e coragem nas disputas (DE ROSE; EDUARDO, 1989).

No final do século XIX, o fisiologista francês Charles Eduard Séquard, ao injetar, em si mesmo, extratos testiculares de cães e porcos, relatou melhora na resistência física e em sua energia intelectual. A testosterona, hormônio sexual masculino, responsável por esses efeitos, só foi isolado em 1935, por Ruzica e Welstein. Em 1945, houve a popularização das ações deste hormônio no meio atlético com a publicação do livro *The male Hormone*, largamente lido. A partir daí o uso da testosterona tornou-se comum entre os atletas das várias modalidades (YESALIS et al., 2000).

O termo andrógeno é de origem grega, onde andro significa homem e gennan, produzir. A definição biológica de um andrógeno é qualquer substância que produz especificamente o crescimento das gônadas masculinas. Na espécie humana, existem cinco formas principais de andrógenos circulantes: a testosterona, diidrotestosterona (DHT), androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu derivado sulfatado (DHEAS) (HANDA; PRICE, 2000).

Várias décadas depois, em 1930, a testosterona foi isolada e caracterizada, e sua denominação foi usada pela primeira vez na Alemanha, onde: testo = testes, ster = esterol e ona = cetona. As células intersticiais do testículo (Células de Leydig) promovem a síntese da testosterona, que desempenha um papel importante na espermatogênese, desenvolvimento das características sexuais secundárias, liberação de gonadotrofinas e estimulação de síntese proteica (TASGIN; LOK; DEMIR, 2011).

A Testosterona é o principal hormônio esteroide androgênico derivado a partir da molécula de colesterol e produzido principalmente pelas células de Leydig nos testículos, e em menor proporção pelas gônadas femininas e glândula suprarrenal. Os efeitos fisiológicos da testosterona são designados como androgênicos e anabólicos, sendo o primeiro responsável pela determinação das características sexuais masculinas primárias e secundárias, e o segundo, associado com ação

miotrófica, aumentando a síntese proteica no músculo, e consequentemente aumento da massa muscular (LIU; DEATH; HANDELSMAN, 2003).

A testosterona promove ações em diversos tecidos-alvo, como no sistema reprodutor, o sistema nervoso central, o rim, o fígado, os músculos e o coração e pode ser metabolizada a outros esteroides ativos (SHAHIDI, 2001). Isso ocorre pela ação de enzimas locais, como a 5- α redutase e a aromatase. A primeira forma o metabólito di-hidrotestosterona (DHT), que atua em receptores androgênicos (RA), e a segunda, em estrógenos, que atuam sobre receptores estrogênicos (RE) (Figura 1). O DHT possui uma maior afinidade com receptores androgênicos que a própria testosterona (LIU; DEATH; HANDELSMAN, 2003; HARTGENS; KUIPERS, 2004).

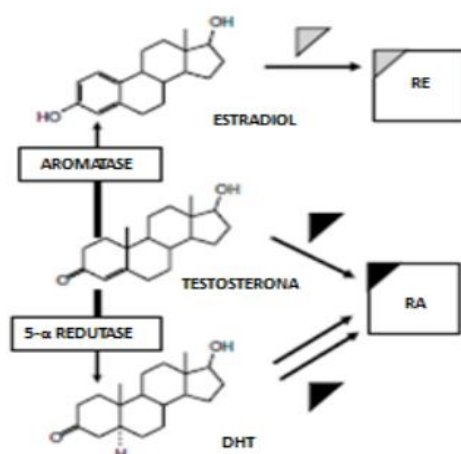


FIGURA 1. Conversão da testosterona a di-hidrotestosterona (DHT) e estradiol. A testosterona é irreversivelmente convertida pela enzima 5^a-redutase a DHT, que se liga com maior afinidade ao receptor de androgênio (RA) ou pela aromatase em estradiol que se liga ao receptor do estrogênio (RE). Modificado de Kicman (2008).

Os esteroides hormonais podem ser classificados em esteroides que possuem efeitos importantes sobre o metabolismo intermediário (cortisol, por exemplo), esteroides que exercem principalmente atividade de retenção de sal (aldosterona, por exemplo) e os que exibem atividade estrogênica ou androgênica. Nos homens, a testosterona é o andrógeno mais importante secretado pelos testículos, sendo produzidos diariamente cerca de 8 mg de testosterona, cerca de 95% pelas células de Leydig e apenas 5% pelas suprarrenais. Nas mulheres, pequenas quantidades de testosterona são sintetizadas pelos ovários e pelas suprarrenais (HEDGE; COLBY;

GOODMAN, 1988). Os EAAs são substâncias derivadas e/ou sintetizadas da testosterona (MARQUES; PEREIRA; AQUINO NETO, 2003).

A síntese dos hormônios androgênicos dá-se a partir do colesterol. Este irá formar, após sucessivas oxidações, a pregnenolona. A pregnenolona é o principal precursor dos hormônios esteróides. Durante a conversão da pregnenolona à testosterona, ocorre a formação de desidroepiandrosterona (DHEA) e de androstenediona (HANDELSMAN, 2001).

Os esteroides anabólicos andrógenos (EAAs) foram inicialmente desenvolvidos com fins terapêuticos, como exemplo, para o tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos, na recuperação de cirurgias e atrofia muscular, por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra e reduzindo o aumento de tecido adiposo, e, também, no tratamento da osteoporose, do câncer de mama e anemias, uma vez que estimulam a eritropoiese (CELOTTI; CESI, 1992; CREUTZBERG et al., 2003; HEBERT et al., 1984).

Por volta de 1954 surgiu o primeiro relato da utilização dos EAAs como objetivo não terapêutico, para melhoria do desempenho esportivo. Este fato ocorreu na Áustria, em um campeonato de levantamento de peso, por atletas do time russo. Com base nestas informações essas substâncias têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar a massa muscular, melhorar o desempenho físico e a estética corporal tanto por atletas profissionais e como por amadores (CUNHA et al., 2005).

Em geral há mais de 100 EAAs disponíveis no mercado que possuem, de forma indissociável, efeitos androgênicos e anabólicos (KUHN, 2002). Por isso é mais apropriado usar o termo esteroides anabólicos-androgênicos (EAAs) (YESALIS et al., 2000; SHAHIDI, 2001). Os efeitos anabólicos promovem síntese proteica, crescimento muscular e eritropoiese (SHAHIDI, 2001), enquanto os efeitos androgênicos são responsáveis pelo desenvolvimento de órgãos reprodutores masculinos e características sexuais secundárias (HUHTANIEMI et al., 1992) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos androgênicos e anabólicos dos EAAs descrito por Ghaphery, (1995).

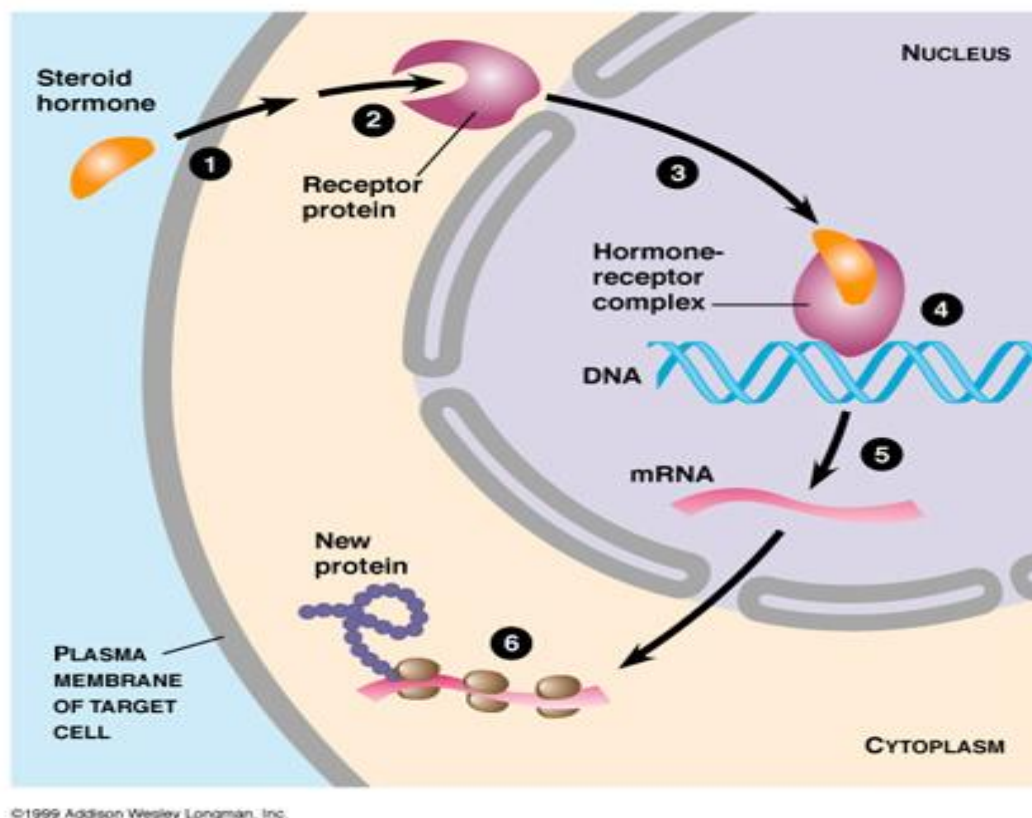
Efeitos androgênicos	Efeitos anabólicos
Crescimento do pênis	Aumento da massa muscular esquelética
Espessamento das cordas vocais	Aumento da concentração de hemoglobina
Aumento da libido	Aumento do hematócrito
Aumento da secreção nas glândulas sebáceas	Aumento da retenção de nitrogênio
Aumento de cabelos do corpo e da face	Redução dos estoques de gordura corporal
Padrão masculino dos pêlos pubianos	Aumento da deposição de cálcio nos ossos

Os EAAs podem ser utilizados por via oral ou intramuscular. Os EAAs injetáveis mais utilizados são o Decanoato de Nandrolona (DecaDurabolin), Fenpropionato de Nandrolona (Durabolin), Durateston (Cipionato de Testosterona) Equipoise (Undecilenato de Boldenona) (ARAUJO, 2006).

2.2. Mecanismo de ação dos EAAs

Segundo Shahidi, (2001), os esteroides podem atuar diretamente em receptores específicos, sendo que, uma vez na circulação, estes são transportados pela corrente sanguínea como mensageiros, na forma livre ou combinada às moléculas transportadoras, mas somente na sua forma livre difundem-se diretamente através da membrana plasmática de células-alvo ligando-se a receptores proteicos intracelulares. Dentro da célula, a molécula de esteroide liga-se ao receptor androgênico específico, migra para o núcleo celular, produzindo um ativado complexo hormona-receptor, onde inicia o processo de transcrição gênica e de transdução proteica, a qual modula as ações celulares dependentes de andrógeno.

Figura 2: Mecanismo de ação dos esteroides anabólicos androgênicos.



2.3. Decanoato de nandrolona

O decanoato de nandrolona (DN) é um anabolizante esteroide andrógeno. Trata-se de primeiro derivado sintético da testosterona que teve suas propriedades anabólicas e androgênicas suficientemente separadas para uso clínico (KICMAN, 2008; BARCELOUX; ROBERT; PALMER, 2013). A remoção do grupo 19-metil foi o que possibilitou a redução dos efeitos androgênicos, mas com manutenção dos efeitos anabólicos comparado ao propionato de testosterona (GAO; BOHL; DALOM, 2005).

O DN foi introduzido no mercado em 1962 como uma preparação anabólica injetável, com ação prolongada de três semanas após administração intramuscular em humanos sua substância ativa é uma nandrolona, que comparativamente à testosterona, apresenta moderado potencial androgênico e elevada atividade anabólica (PERRY et al., 2005, SILVA et al., 2007). Essa substância é formada pela esterificação de um grupo 17 α -hidroxil com ácido decanoico, um ácido graxo de

cadeia longa. Essa droga é liberada lentamente na corrente sanguínea após injeção intramuscular, exercendo sua atividade anabólica ótima acima de seis a sete dias (MOTTRAM; GEORGE, 2000; SHAHIDI, 2001).

Sua maior capacidade anabólica que androgênica em relação à testosterona se deve ao fato do metabólito da nandrolona, conhecido como dihidronandrolona (DHN) pela ação da 5 α -redutase, ter menor afinidade pelo receptor androgênico, além disso, essa enzima é reduzida no músculo, assim, a própria nandrolona medeia resposta anabólica nos receptores sem necessitar de conversão, como ocorre entre a testosterona e seu metabólito ativo, DHT (KICMAN, 2008). A lista de esteroides mais utilizados, segundo o *National Institute on Drug Abuse* encontra-se na Figura 3:

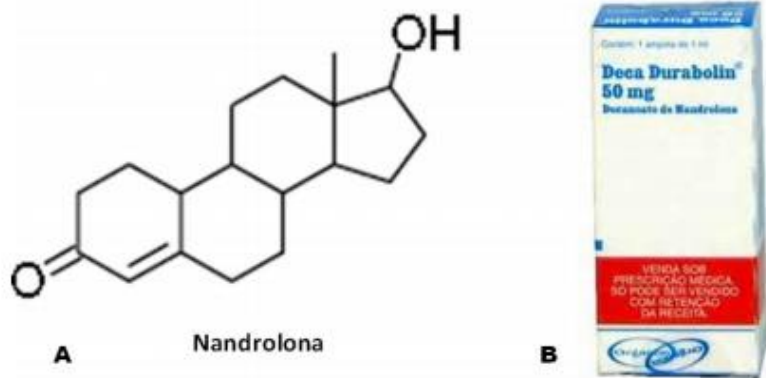
Tabela 2. Esteroides anabólicos mais consumidos segundo o NIDA (2001).

Esteróides orais	Esteróides injetáveis
Anadrol® (oximetolona)	Deca-Durabolin® (decanoato de nandrolona)
Oxadrin® (oxandrolona)	Durabolin® (feniilpropionato de nandrolona)
Dianabol® (metandrostenolona)	Deposteron® (cipionato de testosterona)
Winstrol® (estanozolol)	Equipoise® (undecilenato de boldenona)
Hemogenin® (ometalona)	Testosterona cipionato® (cipionato)

Comparativamente à testosterona, a nandrolona apresenta uma maior ação anabólica e menor atividade androgênica (WILSON; FOSTER, 1988), sendo mundialmente um dos EAAs mais utilizados (KUTSCHER et al., 2002). Quando a nandrolona entra na célula, também sofre ação da 5 α -redutase. Entretanto, o metabólito resultante, ao contrário da DHT, tem baixa afinidade pelo receptor androgênico. Esta conversão ocorre em grandes proporções nos órgãos sexuais, devido às altas concentrações da enzima 5 α -redutase, e em menor escala nos músculos esquelético e cardíaco. Assim, os efeitos androgênicos da nandrolona são menores do que os da testosterona. Nos músculos, como a presença de 5 α -redutase é menor, a própria nandrolona interage com os receptores para esteroides, produzindo respostas anabólicas relativamente maiores (CELOTTI; CESI, 1992). Além disto, a nandrolona é classificada como um andrógeno não aromatizável (HOBBS; JONES; PLYMATE, 1996), minimizando os feitos indesejáveis feminilizantes decorrentes da utilização do EAAs em doses supra-fisiológicas ou por

longos períodos (KUHN, 2002). A molécula da nandrolona pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura molecular na nandrolona.



Fonte: (Kicman, 2008; e www.mundo.anabolico.blogspot.com ; adaptado por SENOS 2013).

A nandrolona é metabolizada no organismo humano em norandrosterona e noreticolanolona, sendo excretada na urina na forma conjugada glicoconjugada tendo a norandrosterona como principal metabólito da nandrolona, a qual apresenta maior concentração na urina e a mais longa excreção (MARQUES; PEREIRA; AQUINO-NETO, 2003).

As substâncias ativas, incluindo metabólitos reduzidos (5- α -redutase é responsável pela redução da nandrolona em 5- α dihidronandrolona) atravessam a membrana celular e liga-se com alta especificidade e baixa afinidade a receptores citoplasmáticos para esteroides, onde o complexo droga-receptor é translocado para o núcleo e se liga à cromatina, levando a transcrição do RNAm e a produção de proteínas específicas e gerando seus efeitos (LIZE et al.,1999).

Alguns estudos apontam que o decanoato de nandrolona pode modular a regulação do ciclo celular e, assim, alterar a massa muscular, mas os processos intramusculares ainda não estão bem esclarecidos (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002; MCCLUNG et al., 2005).

O DN é um EAAS que é amplamente utilizado hoje em dia. Este tem a capacidade de reduz FSH e a secreção hormonal luteinizante (LH) através de um mecanismo de feedback negativo e, posteriormente, leva a distúrbios menstruais e foliculares (HARTGENS; KUIPERS, 2004).

2.4. Efeitos dos EAAs no sistema reprodutor e ciclo estral

Visto que os EAAs são derivados da testosterona eles exercem efeitos importantes no sistema reprodutor e nos hormônios sexuais. Administração de EAAs provoca distúrbio na produção endógena de testosterona e gonadotrofinas (LH e FSH). A administração exógena dessas substâncias afeta o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, resultando num *feedback* negativo na secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) que, por sua vez, diminuem a produção de testosterona endógena, resultando na redução da espermatogênese (LISE et al., 1999). Assim, a virilidade e a fertilidade normais do homem necessitam de um controle direto do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Tradicionalmente, sabe-se que o diagnóstico da infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros estudados após ejaculação, com ênfase na concentração, morfologia, motilidade e vitalidade dos espermatozóides (GUERRA; BION; ALMEIDA, 2005).

O efeito dos esteróides anabolizantes sobre a espermatogênese ocorrem através de uma retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal, inibindo tanto a secreção hipotalâmica de GnRH como a do FSH e LH hipofisário HAY, (2002), induzindo um hipogonadismo (TUREK et al., 1995), além de ter também um efeito gonadotóxico direto.

Experimentos em modelos animais e humanos descrevem alterações no sistema reprodutor ocasionando pelos EAAs. Tais alterações no sistema reprodutor parecem ser reversíveis após interrupção do uso da droga (KARBALAY-DOUST et al., 2007). Nas mulheres, os efeitos colaterais provocados pelo consumo do EAAs incluem alterações na menstruação, engrossamento da voz, encolhimento dos seios, aumento da libido, crescimento de pelos no corpo e aumento do tamanho de clitóris (MELNIK; JANSEN; GRABBE, 2007).

Segundo Chuffa; Amorim; Teixeira (2011), ratas tratadas com decanoato de nandrolona, o deca-durabolin, dosagem de 5 mg/kg/dia aplicando uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas demonstram aciclicidade estral, diminuição da espessura de ambos, epitélio e estroma endometrial, além de redução no número e tamanho dos vasos sanguíneos uterinos. Far et al. (2007) utilizando a mesma dosagem demonstrou alterações na morfologia uterina, tais como atrofia do endométrio e glândulas tortuosas.

Embora os estudos relatem principalmente o uso de EAAs por homens, tem-se observado um aumento significativo do uso por mulheres durante a última década (YESALIS et al., 2000; THIBLIN; PETERSSON, 2004). Poucos estudos sobre quaisquer aspectos dos efeitos dos EAAs na população humana ou animal têm sido realizados em fêmeas (CLARK; FAST, 1996). Este panorama não se alterou nos últimos anos, principalmente na área morfológica reprodutiva. Apesar de ainda serem escassos os estudos sobre os efeitos que os EAAs causam na reprodução feminina, estudos relataram que o esteroide sintético decanoato de nandrolona é capaz de causar interrupções do ciclo estral (GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005; CAMARGO et al., 2009; CHUFFA; AMORIM; TEIXEIRA, 2011; CAMARGO et al., 2014), histopatologias nos ovários e útero (GEREZ FREI; CAMARGO, 2005; CAMARGO et al., 2009; CHUFFA; AMORIM; TEIXEIRA, 2011; CAMARGO et al., 2014) e suprimir capacidade reprodutiva das fêmeas (CAMARGO et al., 2009; CAMARGO et al., 2014; BELARDIN et al., 2014).

Ao longo da última década, o uso de EAAs por mulheres aumentou significativamente (THIBLIN; PETERSSON, 2004), e seus efeitos adversos incluem o engrossamento da voz, o crescimento do pelo no corpo, atrofia das mamas, irregularidades menstruais e hipertrofia do clitóris (MARAVELIAS et al., 2005; KICMAN, 2008).

Estudos com animais mostraram que a DN causa alterações no ciclo estral (GEREZ; FREI; CAMERGO, 2005; CAMARGO et al., 2009; CHUFFA; AMORIM; TEIXEIRA, 2011), supressão da capacidade reprodutiva (CAMARGO et al., 2014; BELARDIN et al., 2014) e câncer nos ovários e alterações histopatológicas no útero (GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005; CAMARGO et al., 2009; CHUFFA; AMORIM; TEIXEIRA, 2011; CAMARGO et al., 2014), que pode ser dose e efeito dependente do tempo (BELARDIN et al., 2014). Há vários estudos enfatizando os efeitos adversos do abuso de diversos EAAs em mulheres adultas, no entanto, os efeitos fisiológicos do abuso deste por adolescentes do sexo feminino no início da puberdade são ainda desconhecidos, e não há preocupação de que alguns dos possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985).

O ciclo menstrual, consiste no sangramento vaginal periódico decorrente da descamação da camada uterina, porém em outros mamíferos que não possuem este

sangramento, esses eventos endócrinos são correspondentes aos do ciclo menstrual e os hormônios atuantes também são os mesmos (BARRETT et al., 2014), este período é denominado ciclo estral, podendo ser visualizada na figura 4.

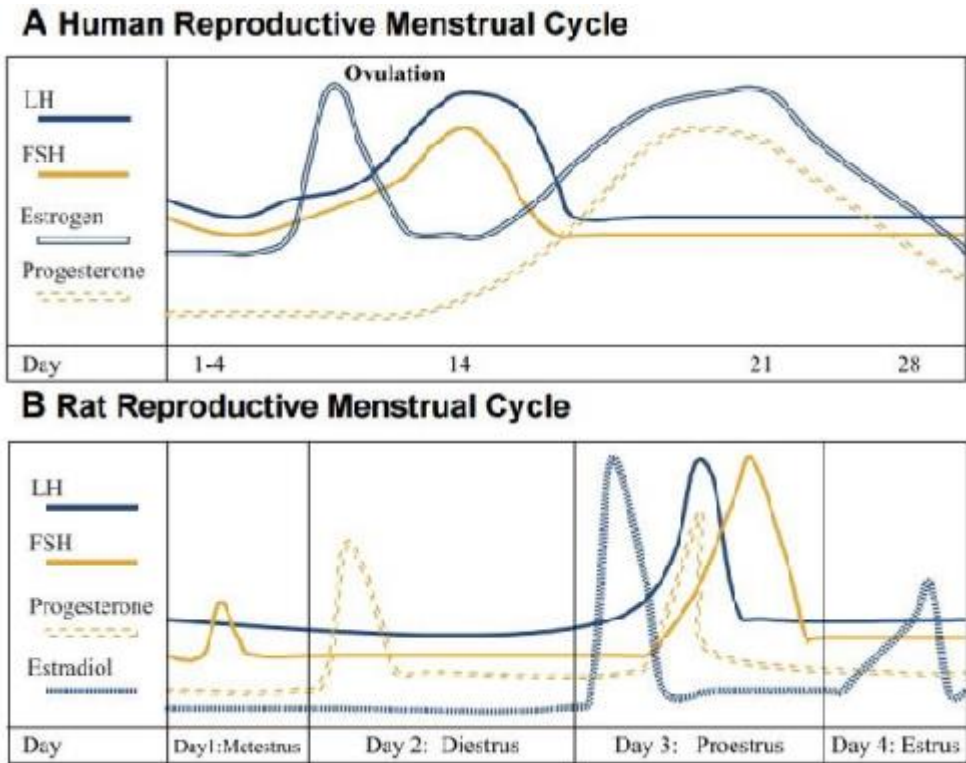


Figura 4. Variações cíclicas das gonadotrofinas hipofisárias, estrógeno e progesterona durante o ciclo reprodutivo humano (A) e do rato (B). LH: Hormônio Luteinizante; FSH: Hormônio Folículo Estimulante (EMANUELE; WEZEMAN; EMANUELE, 2002).

O ciclo estral em ratas é subdividido em quatro fases, proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II), nas quais os ovários, útero e vagina apresentam morfologia característica em cada estágio (DIXON et al., 2014). O proestro apresenta o aumento dos níveis séricos de estradiol, possui uma atividade proliferativa do epitélio vaginal, com o predomínio de células arredondadas, polinucleadas podendo estar dispersas ou agrupadas, o estro representa a queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas”, Os períodos diestro I e II apresentam concentrações baixas do nível sérico de estradiol e ao esfregaço vaginal exibem leucócitos em número mais alto, poucas

células fusiformes cornificadas e algumas células epiteliais, sendo o diestro II praticamente constituído apenas por leucócitos (VILELA; JUNIOR; SILVA, 2007).

3. REFERENCIAS

ARAUJO L. R. Utilização de suplemento alimentar e anabolizantes por praticantes de musculação nas academias de Goiânia – GO. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.10, n. 3, p. 13-18, 2006.

BARCELOUX, D. G.; ROBERT, M. D.; PALMER, B. P. ANABOLIC – **androgenic steroids**. v. 59, p. 226-248, 2013.

BARRETT, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. L. **Fisiologia médica** de Ganong. 24^a ed. Porto Alegre (RS): McGraw-Hill; 2014.

BARROS, D. D.; SILVA, V. C.; SILVA, I. A.; FERREIRA, E. A. A. P. Anabolizantes: Uma Abordagem Científica. *Revista Brasileira de Educação em Saúde*, v.4, n.1, p. 29-40, 2014.

BAULIEU, E. E. Some aspects of the mechanism of steroid hormones. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 7, n. 3, p. 157-174, 1975.

BELARDIN, L. B.; SIMÃO, V. A.; LEITE, G. A. A.; CHUFFA, L. G. A.; CAMARGO, I. C. C. Efeitos dependentes da dose e a reversibilidade dos danos causados por Decanoato de Nandrolona em Tecido uterino e fertilidade dos ratos. Defeitos de Nascimento **Research Part B: Desenvolvimento e Reproductive Toxicology**, v. 101, p. 168-177, 2014.

CAMARGO, I. C. C.; LEITE, G. A. A.; PINTO, T.; RIBEIRO-PAES, J. T. Descobertas histopatológica em os ovários e útero de ratas albinas promovidas por co-administração de sintético esteroides e nicotina. **Experimental Toxicologia e Patologia** v. 66, p. 195-202, 2014.

CAMARGO, I. C. C.; SOUZA R. B.; MESQUITA S. F. P.; CHUFFA L. G. A.; FREI F. Histologia ovário a e contagem folicular em ratas tratadas com decanoate nandrolona e submetidos a Esforço físico. **Journal Acta Biologica Hungarica**, v. 60, n. 3, p. 253-261, 2009.

CELOTTI, F.; CESI, N. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 43, n. 5, p. 469-477, 1992.

CHUFFA, L. G.; AMORIM, J.P.; TEIXEIRA, G. R. A longo prazo melatonina exógena tratamento modula a eficiência global de alimentação e protege o tecido do ovário contra lesões causadas pelo stress oxidativo induzido pelo etanol em ratos adultos UChB. **Alcoholism Clinical Experimental Research**. v. 35, p. 1498-1508, 2011.

CLARK, A. S.; FAST, A. S. Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. **Behavior Neuroscience**, v. 110, p. 1478-1486, 1996.

387 CREUTZBERG, E. C.; WOUTERS, E. F.; MOSTERT, R.; PLUYMERS, R. J.;
 388 SCHOLS, A. M. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with
 389 COPD? A double blind, placebo- controlled, randomized trial. **Chest**. v. 124 n. 5, p.
 390 1733-1742, 2003.

391 CUNHA, T. S.; TANNO, A. P.; COSTA SAMPAIO MOURA, M. J.; MARCONDES, F.
 392 K. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid
 393 treatment on rat tissue glycogen content. **Life sciences**, v. 77, n. 9, p. 1030-1043,
 394 2005.

395 CUNHA, T. S.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K.; PEREZ, S. E. A.; SELISTRE-
 396 ARAUJO, H. S. A Administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo
 397 sóleo em ratos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 50, n.
 398 3, p. 532-540, 2006.

399 DE ROSE, EDUARDO. H. O. Uso de Anabólicos esteroides e suas repercussões na
 400 Saúde. In: QUINTA, GERALDO. Valores humanos, corpo e prevenção à procura de
 401 novos paradigmas para educação física Brasília. **Ministério da Educação**. 1989,
 402 129p.

403 DIXON, D.; ALISON R.; BACH, U.; COLMAN, K.; FOLEY, G. L.; HARLEMAN, J. H.;
 404 HAWORTH, R.; HEBERT, R.; HEUSER, A.; LONG, G.; MIRSKY, M.; REGAN, K.;
 405 ESCH, E. V.; WESTWOOD, F. R.; VIDAL, J.; YOSHIDA, M. Nonproliferative and
 406 proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Jornal of**
 407 **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 3–4, p. 1S-107S, 2014.

408 DUTRA, B. S. C.; PAGANI, M. M.; RAGNINI, M. P. Esteróides anabolizantes – uma
 409 abordagem teórica. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio**
 410 **Ambiente**, v.3, n. 2, p.21-39, 2012.

411 EMANUELE, M. A.; WEZEMAN, F.; EMANUELE, N. V. Alcohol's effects on female
 412 reproductive function. **Alcohol Research and Health**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2002.

413 FAR, H. R. M.; AGREN, G.; LINDQVIST, A. S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.;
 414 THIBLIN I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate
 415 te female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in
 416 reproductive capacity. **The European Journal of Obstetrics & Gynecology and**
 417 **Reproductive Biology**. v. 131, p. 189-197, 2007.

418 FERMO R.S, REGO J.N.I, FRANQUINI J.V.M, ANDRADE T.U. Efeito da
 419 suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em
 420 ratos. **Revista Eletronica Farmacia**, v.5, n. 1, p.111-121, 2008.

421 GAO, W.; BOHL, C.E.; DALTON, J.T. Chemistry and structural biology of androgen
 422 receptor, **Chemical Reviews**. v. 105, n. 9, p. 3352–3370, 2005.

423 GEREZ, J R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. A avaliação histológica dos ovários e do
 424 útero de ratos submetidos a tratamento decanoato de nandrolona. **Contracepção** v.
 425 72, p. 77-80, 2005.

426 GUERRA, T. M. M; BION, F. M; ALMEIDA, M. G. Avaliação de Espermograma e
 427 PSA em Praticantes de Musculação Atlética (Fisiculturistas). **Fitness e Performance**
 428 **Journal**. v. 4, p. 220-226, 2005.

429 HANDA J. R, PRICE R. H. Androgen Action. In: Fink G, editors. Encyclopedia of
 430 Stress. USA: **Academic Press**. v. 5 p. l83 -188, 2000.

431 HANDELSMAN, D. J. Androgen action and pharmacologic uses. In: De GROOT L.
 432 J.; JAMESON, J. L. editors. **Endocrinology**. Philadelphia: Saunders; p. 232-242,
 433 2001.

434 HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes.
 435 **Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p. 513-554, 2004.

436 HAY, P. J. Epidemiologia dos transtornos alimentares: estado atual e
 437 desenvolvimentos futuros. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 24, n. 3, p. 13-17,
 438 2002.

439 HEBERT, A.; HAUPT, M. D.; GEORGE D.; ROVERE, M. Anabolic steroids: a review
 440 of the literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v.12, n.6, p.469-484,
 441 1984.

442 HEDGE, G. A.; COLBY, H. D.; GOODMAN, R.L. Fisiologia endocrina clínica. São
 443 Paulo: **Interlivros Edicoes Ltda**. p.151-175,1988.

444 HOBBS, C. J.; JONES, R. E.; PLYMATE, S. R. Nandrolone, a 19-Nortestosterone,
 445 enhances insulin-independent glucose uptake in normal men. **The Journal of**
 446 **Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 81, n. 4 , p. 1582-1585, 1996.

447 HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N. A. Medical issues associated with anabolic steroid
 448 use: are they exaggerated? **Journal of Sports Science and Medicine**. v. 5, p. 182-
 449 193, 2006.

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

453 HUHTANIEMI, I.; KOSKIMIS, A.; PELKONEN, R.; KIVEKSET in **Kliininen**
 454 **endokologia**. LAMBERG B-A, KOIVISTOV, PELKOMEN R eds. Duodecim,
 455 Jyväskylä, p. 458-478,1992.

456 IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Culto ao corpo e uso de
 457 anabolizantes entre praticantes de musculação. **Caderno de Saúde Pública**. v. .25,
 458 n. 4, p. 773-782, 2009.

459 KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgical Focus**, v. 10, n. 4, p. 1,
 460 2001.

461 KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAM, A.; ARDEKANI, MIRKHANI, H. The
 462 reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male
 463 rats. **Asian Journal of Andrology**. v. 37, p. 235-239, 2007.

464 KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of**
 465 **Pharmacology**. v. 154, n. 3, p. 502-521, 2008.

466 KOHLER, R. M. N., LAMBERT, M. I. Urine nandrolone metabolites: false positive
 467 doping test? **British Journal of Sports Medicine**. v. 36, p. 325, 2002.

468 KOLAR, P., SCHMIDT-BLEEK, K., PH, D., SCHELL, H., GABER, T., TOBEN, D.,
 469 SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G. N. The early fracture
 470 hematoma and its potential role in fracture healing. **Tissue Engineering: Part B**, v.
 471 16, n. 4, p. 427–434, 2010.

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

474 KUTSCHER, E. C.; LUND, B. C.; PERRY, P. J. Anabolic steroids: A review for the
475 clinician. **Sports Medicine**, v. 32, n. 5, p. 285-296, 2002.

476 LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in
477 surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2011.

478 LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and cardiovascular
479 disease. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 3, p. 313-340, 2003.

480 LIZE, M. I.; GAMA, E.; SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O abuso de
481 esteroides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica**
482 **Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 364-370, 1999.

483 MARAVELIAS, C.; DONA, A.; STEFANIDOU, M.; SPILIOPOULOU, C. Os efeitos
484 adversos do anabolizante esteróides em atletas - Uma ameaça constante.
485 **Toxicology Letters**. v. 158, p. 167-175, 2005.

486 MARQUES, M. A.; PEREIRA, H. M. G.; AQUINO NETO, F. R. Controle de dopagem
487 de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Revista Brasileira de**
488 **Medicina do Esporte**. v. 9, n. 1, p. 15-24, 2003.

489 MCCLUNG, J. M.; MEHL, K. A.; THOMPSON, R. W.; LOWE, L. L.; CARSON, J. A.
490 Nandrolonedecanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat
491 soleus muscle. **The American Journal of Physiology-Regulatory**. v. 288, n. 6, p.
492 1543-1552, 2005.

493 MELNIK, B.; JNSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of anabolic androgenic steroids and
494 bodybuilding acne an underestimated health problem. **Journal Der Deutschen**
495 **Dermatologischen Gesellschaft**. v. 5, p. 110-117, 2007.

496 MOTTRAM, D. R.; GEORGE, A. J. Anabolic steroid. **Baillière's Clinical**
497 **Endocrinology and Metabolism**., v. 14, n. 1, p. 55-69, 2000.

498 PERRY, P. J.; LUND, B. C.; DENINGER, M.J; KUTSCHER, E.C; SCHNEIDER, J.
499 Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey and drug
500 utilization. **Clinic Journal Sport Medicine**. v. 15, p. 326-330, 2005.

501 PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture-healing cascade. **Injury**, v. 36 n. 3, p. 5–7,
502 2005.

503 POPE, H. H. G Jr.; KATZ, D. L. Psychiatric and medical effects of anabolic-
504 androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. **General Psychology**. v.
505 51, p. 375-382, 2004.

506 ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of bone
507 regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews in**
508 **Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197–213, 2007.

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

511 SHUPNIK, M. A.; SCHREIHOFER, D. A. Molecular aspects of steroid hormone
512 action in the male reproductive axis. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 341-344,
513 1997.

514 SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes
515 no esporte. **Revista Brasileira Medicina e Esporte**.v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.

SILVA, P. R. P.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P.; PRESTES, M. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, p. 104-110, 2007.

STRAUSS, R. H.; LIGGETT, M. T.; LANESE, R. R. Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained. **Women Athletes**. v. 253, p. 2873, 1985.

TASGIN, E.; LOK, S.; DEMIR, N. Combined use of testosterone and nandrolone may cause heart damage. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 19, p. 3766-3768, 2011.

THIBLIN, I.; PETERSSON, A. Farmacoepidemiologia de esteróides anabólicos androgênicos: a Reveja. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 19, p. 27-44, 2004.

TUREK, P. J.; WILLIAMS, R. H.; GILBAUGH, J. H. 3rd; LIPSHULTZ, L. I. "The reversibility of anabolic steroid-induced-azoospermia". **Journal of Urology**. v. 153, p. 1628-1630, 1995.

VILELA M. G; JUNIOR J. L. S; SILVA J. G. C. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **Femina**. v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. Ação hormonal de esteróides. In: CLARK, J. H.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Williams: **Tratado de Endocrinologia**. 7^a ed. São Paulo: Manole, v.1, p. 42-95, 1988.

YESALIS, C. E.; COURSON, S. P.; WRIGHT, J. E. HISTORY OF ANABOLIC STEROID USE IN SPORT AND EXERCISE. In: Yesalis C, editor **Anabolic Steroids in Sport and Exercise**.v. 2 nd. Ed Champaign (IL): Human Kinetics, p. 51-72, 2000.

CAPITULO II

Estudo imunohistoquímico e histofisiológico do uso prolongado de nandrolona sobre
órgãos reprodutivos e fertilidade

Laís Caroline da Silva Santos¹; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹; Valéria Wanderley
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: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY-TEIXEIRA V.)

RESUMO

A alta incidência do uso de esteroides anabólicos nas ultimas décadas, ultrapassaram os meios esportivos/competições, e passaram a ser utilizados também por atletas recreacionais e mulheres que o utilizam para fins estéticos, visando o aumento de massa magra e redução de gordura subcutânea. Estudos, no entanto, têm demonstrado que a administração desses anabolizantes tem resultado em efeitos adversos em vários sistemas fisiológicos. Mediante a falta de pesquisas sobre alterações nos órgãos reprodutivos feminino e seu efeito sobre citocinas pró-inflamatórias, esta pesquisa investigou possíveis alterações ou efeitos provocados pelo uso suprafisiológico da nandrolona sobre a morfofisiologia e imunohistoquímica do útero e ovários, bem como seu efeito na fertilidade de ratas Wistar. Foram utilizadas 30 ratas albinas da linhagem *wistar*, com 60 dias de idade e peso aproximadamente de ± 190 g, divididas em três grupos experimentais: controle (C), controle veículo (CV) e tratamento-esteroide (TE), contendo dez animais cada. Os animais do grupo TE foram submetidos a injeções subcutâneas, 5 dias/semana, por 30 dias, na concentração de 5 mg/kg de nandrolona em 1 mL/kg de propilenoglicol. Os animais do grupo controle (C) e controle veículo (CV) foram submetidos às mesmas condições do grupo TE, exceto pela ausência do esteroide. Foi analisada a morfologia do útero e ovários de cinco fêmeas de cada grupo pela técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E). Foi avaliado também o índice organossomático, níveis hormonais (estrôgeno e progesterona), a ciclicidade estral e imunohistoquímica (TNF α , IL6, VEGF e apoptose). As ratas restantes desses grupos foram utilizadas para avaliação da fertilidade. Os resultados mostraram que houve redução do índice organossomático nos ovários e aumento deste fator no útero, bem como aumento do peso corpóreo das ratas submetidas apenas ao esteroide. Essas mesmas ratas apresentaram um quadro de estro permanente, redução dos níveis séricos de estrógenos e progesterona. A análise morfológica revelou ainda ovários sem corpos lúteos, aumento de folículos terciários, e no útero redução significativa do lúmen e glândulas endometriais mais desenvolvidas. A quantificação da expressão para as citocinas TNF α e IL6 revelou aumento significativo nos ovários e útero das ratas tratadas com esteroide. Com relação ao VEGF houve aumento de sua expressão nos ovários das ratas tratadas com o esteróide, entretanto este fator

603 reduziu no útero. Os ovários e úteros dessas ratas apresentaram aumento
604 significativo do índice apoptótico. Assim conclui-se que os efeitos adversos da
605 nandrolona no aparelho reprodutor feminino podem está relacionados à sua
606 interferência na regulação das citocinas pró-inflamatórias e no processo apoptótico
607 normal.

608 **Palavras-chave:** Anabolizantes, ratas, reprodução, imunohistoquímica, níveis
609 hormonal, ciclicidade estral, índice organossomático.

610

1. INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas quimicamente derivadas da testosterona, principal esteroide androgênico e anabólico endógeno masculino (FRINZO; MACEDO; YONAMINE, 2009; ROCHA; AGUIAR; RAMOS, 2014). A grande maioria dos EAAs utilizados refere-se aos fármacos sintéticos baseados na estrutura da molécula de testosterona e seus derivados, que mimetizam os hormônios esteroides naturais (CUNHA et al., 2004; ARALDI et al., 2013; MORAES; CASTIEL; RIBEIRO, 2015; CARNEIRO-JÚNIOR; SILVA; ALMEIDA, 2016), com a finalidade terapêutica.

Dentre os andrógenos mais utilizados podemos destacar o decanoato de nandrolona (DN) que de acordo com o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, 2000) é o EAA mais utilizado no mundo, devido ao seu moderado potencial androgênico associado às boas propriedades anabólicas (BRAGA, 2005). O DN, também chamado de nandrolona, por esta ser sua substância ativa, é utilizada com intuito de promover aumento da massa muscular, ganho de força, e consequentemente melhora na performance física (KOHLEER; LAMBERT, 2002).

Nos últimos tempos, houve uma explosão de técnicas de manipulação e gerenciamento do corpo humano como dietas, cirurgias estéticas e consumo de “drogas da imagem corporal”, dentre as quais se incluem os EAAs, estimuladas por um culto ao corpo ideal presente na sociedade contemporânea (IRIART, CHAVES; ORLEANS, 2009; BOFF, 2010). Apresentando um aumento no número de pessoas e principalmente de mulheres atraídas pelo potente efeito anabólico capaz de aumentar a massa muscular em curto período de tempo (FERREIRA et al., 2014). Levando ao uso suprafisiológico desse andrógeno podendo chegar de 10-100 vezes maiores à dose terapêutica (ROCHA; AGUIAR; RAMOS, 2014).

Segundo Abrahin (2013) as mulheres que cronicamente recebem doses suprafisiológicas de andrógenos, principalmente o decanoato de nandrolona, provocam em seu aparelho reprodutor a redução dos níveis circulantes do hormônio luteinizante, do hormônio folículo-estimulante, dos estrogênios e da progesterona; inibição da foliculogênese e da ovulação; alterações do ciclo menstrual que incluem o prolongamento da fase folicular, encurtamento da fase lútea e, em alguns casos, ocorrência de amenorreia. No útero, a administração de EAAs induz alterações histopatológicas e morfométricas em sua estrutura (MOBINI FAR et al., 2007) podendo causar aumento de peso do órgão (CAMARGO et al., 2014). Porém pouco se sabe sobre as citocinas pró- inflamatórias, que são proteínas ou glicoproteínas produzidas, em células do sistema imune ou outros tipos celulares, em resposta a estímulos inflamatórios (MOLDOVEANU, SHEPHARD, SHEK, 2001) que podem ser expressas nesses órgãos após uso prolongado de EAAs. Dentre as principais citocinas envolvidas na fase aguda de inflamação temos fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (BORISH; STEINKE, 2003).

Sobre o VEGF (fator de crescimento vascular) relacionados a atividades do processo de angiogênese, ou seja, formação de novo vasos sanguíneos (FOLKMAN; SHING ,1992; DVORAK et al, 1995) a literatura relata que esse fator é aumentado com atividade física (WAGNER 2011). Paschoal et al. (2009) sugerem que a administração de EAAs pode ser fortemente prejudicial ao remodelamento muscular e desempenho pelo menos parcialmente devido a uma falha na angiogênese. Além disso pesquisa mostram que a nandrolona pode aumenta a apoptose no testículo levando a uma redução significativa das células germinativas (SHOKRI et al., 2010, GOLDAR et al.,2015).

Apesar dos estudos enfocarem os efeitos adversos do uso abusivo dos EAAs em mulheres, trabalhos detalhados envolvendo a caracterização e análise dos efeitos colaterais reprodutivos em mulheres e fêmeas ainda são escassos na literatura (HARTGENS; KUIPERS, 2004; IP et al., 2010), e não há preocupação de que alguns dos possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva (HOFFMAN; RATAMESS, 2006). Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da administração do decanato de nandrolona em ratas da linhagem *wistar* sobre as alterações morfofisiológicas, interferência na ciclicidade estral, fertilidade dando ênfase as expressões imunohistoquímicas relacionados à citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL6), VEGF e apoptose.

2. MATÉRIAS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizadas 30 ratas albinas da linhagem *wistar*, com 60 dias de idade e peso aproximadamente de $\pm$ 190 g, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidas em ambiente com as respectivas condições, temperatura de 22 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, em regime de alimentação *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética nº: 31/2017.

2.2. Tratamento

Foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, aleatoriamente em três grupos: controle (C), controle veículo (CV), tratamento-esteroide (TE), contendo 10 animais cada. Os animais do grupo TE foram submetidos a injeções intramuscular, 5 dias/semana, em um período de 30 dias, na concentração de 5 mg/kg de nandrolona diluído em 1 mL/kg de propilenoglicol, utilizado como veículo; doses baseadas no modelo de dependência descrito por Breuer et al. (2001). Os animais do grupo controle (C) e controle veículo (CV) foram submetidos às mesmas condições do grupo TE, exceto pela ausência do esteroide.

2.3. Análise morfológica

Cinco fêmeas dos grupos C, CV e TE foram anestesiadas ao final do experimento para coleta dos ovários e útero, sendo estes pesados em balança analítica. Para o procedimento foi utilizado o hidrocloreto de cetamina na dosagem de 80 mg/kg e xilazina na dosagem de 20 mg/kg, ambos administrados por via intramuscular. Os órgãos coletados foram imersos em formol a 10% por um período de 24 h, clivados e processados para inclusão em parafina. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo de tipo minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm e submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), analisando em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.4. Calculo do índice organossomático

O índice organossomático foi utilizado para observação do aumento dos ovários e útero como um indicativo da ação da nandrolona. Para tanto foi calculado a razão entre os pesos dos órgãos 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 Análise da ciclicidade estral

O ciclo estral das fêmeas foi analisado do 5º ao 30º dia de tratamento compreendendo, assim, cinco ciclos estrais. As fases de proestro, estro, metaestro e diestro foram identificadas conforme critérios descritos por Mandl (1951).

2.6. Dosagem hormonal

O sangue (1 mL) foi coletado nas ratas aos 60, 70, 80 e 90 dias de nascidas, mediante a contenção mecânica (FLUTTERT; DALM; OITZL, 2000). A coleta foi realizada através da punção da veia caudal lateral como o uso de um cateter (24G). A dosagem dos níveis hormonais foi realizada mediante obtenção do plasma dos animais. O material foi rapidamente centrifugando, o sobrenadante acondicionado em microtúbulos e mantido em freezer a -20 °C até a dosagem hormonal (TEIXEIRA et al., 2004). Os níveis dos hormônios estradiol e progesterona foram dosados utilizando-se do método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), através de KIT's comerciais. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.7 Acasalamento

As cinco fêmeas restantes dos grupos C, CV e TE foram submetidas ao acasalamento diariamente, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã seguinte

(06:00h), foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozóides nos esfregaços vaginais, através de análises microscópicas OLYMPUS BX-49, após a confirmação do acasalamento foram consideradas como primeiro dia de gestação.

2.8. Imunohistoquímica (VEGF, IL6 e TNF- α)

Para análise imunohistoquímica, as lâminas silanizadas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contra corados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

2.9. Índice apoptótico

Para isso foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida,

incubados em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, 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 equilíbrio por 60 minutos a 4 °C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37 °C 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, DakoCytomation™) ($\pm$ 20 minutos), sendo contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, 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. O índice apoptótico foi determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013).

2.9. *Análise de estatística*

A análise estatística das fases do ciclo estral, dosagens hormonais, índice gonadossomático e imunohistoquímica foram realizadas por meio do método não-paramétrico de Kruskal- Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% ($p < 0,05$) de significância.

3. RESULTADOS

3.1 *Pesos das ratas, útero e ovários e índice organossomático*

Os resultados demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) no peso corpóreo e útero das ratas submetidas à administração do decanoato de nandrolona, entretanto, evidenciou-se redução no peso dos ovários dessas ratas (Tabela 1). A análise do índice organossomático confirmou redução e aumento significativo no peso dos ovários e útero, respectivamente, nas ratas submetidas ao esteróide (Figuras 2 e 3).

3.2 Ciclicidade estral

O ciclo estral se manteve regular nas cinco fêmeas do grupo controle e controle veículo durante o período experimental, passando por todas as fases do ciclo, enquanto que, em todas as fêmeas do grupo TE, houve predominância da fase estro e redução significativa das fases metaestro e diestro (Figura 4).

3.3 Análises morfológicas

Os ovários das ratas dos grupos controle e controle veículo apresentaram vários folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento, além de corpo lúteo e sua região medular ricamente vascularizada (Figuras 5A, B, C e D). No grupo tratamento esteroide evidenciou-se presença de vários folículos terciários, ausência de corpos lúteos e na região medular rica vascularização semelhantemente aos demais grupos experimentais (Figura 5E e F).

A análise histológica uterina demonstrou redução significativa do lúmen, bem como presença de glândulas endometriais mais desenvolvidas nas ratas do tratamento esteroide (Figura 6).

3.4 Dosagem hormonal

Os níveis séricos de estrógenos e progesterona reduziram significativamente apenas nas ratas submetidas ao tratamento esteroide a partir de 10 dias do início da administração (Figuras 7 e 8).

3.5 Imunohistoquímica para TNF α , VEGF e IL-6

A quantificação da expressão para as citocinas TNF α e IL-6 revelou aumento significativo nos ovários e útero das ratas tratadas com esteroide (Figuras 9, 10, 11 e 12). Com relação ao VEGF houve aumento de sua expressão nos ovários das ratas tratadas com o esteróide, entretanto este fator reduziu no útero (Figuras 13 e 14).

3.6 Índice apoptótico

O índice apoptótico nos ovários e útero das fêmeas tratadas com nandrolona apresentaram-se elevados em relação as demais grupos (Figuras 15 e 16).

3.7 Prenhez

As ratas do grupo C e CV acasalaram e tiveram em média de 8 a 10 filhotes, entretanto as ratas do grupo TE acasalaram, mas não ficaram prenhes.

4. DISCUSSÃO

Grande parte dos autores da comunidade científica utilizam o termo EAA ou anabolizantes em referência aos fármacos sintéticos baseados na estrutura da molécula de testosterona e seus derivados, que mimetizam os hormônios esteroides naturais (CUNHA et al., 2004; WEINECK, 2005; ARALDI et al., 2013; MORAES; CASTIEL; RIBEIRO, 2015; CARNEIRO-JÚNIOR; SILVA; ALMEIDA, 2016). Apesar

dos EAAs serem fabricados para fins de agentes terapêuticos em pacientes em estado catabólico, a sua propriedade miotrófica ou capacidade de aumento da massa muscular, aumento de força e o desempenho atlético, (SANTOS, 2007), geram a procura desta droga, principalmente pelo gênero feminino que teve uma expressiva acessão nas últimas décadas (IRVING et al., 2002; THORLINDSSON; HALLDORSSON, 2010; ACEVEDO et al., 2011. Assim, o presente estudo teve como objetivo demonstrar a ação do uso de Decanoato de Nandrolona (DN) e seus efeitos sobre o peso corporal, ciclicidade estral, citocinas pró-inflamatórias e de proliferação, alterações hormonais, fertilidade e apoptose, provando que este interfere na fisiologia do sistema reprodutor feminino, durante o tratamento de 30 dias.

O presente estudo demonstrou um aumento significativo do peso corpóreo do grupo tratado com nandrolona quando comparado aos dos grupos controles, tendo um aumento de cerca 75 % no peso. Esse ganho parece ser resultante da função anabólica desta droga, que liga-se a receptores e antagoniza a ação catabólica do cortisol reduzindo a degradação de proteínas e aumentando assim a fixação de nitrogênio (KICMAN, 2008), provocando por consequência, o crescimento do tecido muscular e hipertrofia das fibras, elevando também o numero de lipídios (FORTUNATO; ROSENTHAL; CARVALHO, 2007), assemelhando-se aos resultados encontrados por GRACELI et al. (2005).

Outra alteração observada após a administração do DN foi à redução de 50% do peso do ovário, caracterizando uma atrofia. Esta redução pode esta ligada ao feedback negativo podendo ser suprimido pelos altos níveis de andrógeno circulante, reduzindo a liberação de gonadotrofinas, fazendo com que os ovários reduzam ou não sintetizem estrógeno (ZANAROTTI, 2012). Já no útero a ação foi contraria a observada no ovário, ocorrendo um aumento. Este fato deve-se,

provavelmente, às alterações histopatológicas e a intensa secreção luminal (GRACELI, 2005). Para evidenciar essa redução foi feito o calculo do índice organossomatico, como um indicativo da ação da nandrolona. Para tanto foi calculado a razão entre o peso dos órgãos pelo peso corpóreo de cada animal, e obtido esse índice, ficando certificado as alterações causadas após a administração do andrógeno.

Folículos terciários, ausência de corpos lúteos e uma região medular ricamente vascularizada, foram características morfológicas observadas nos ovários submetidos ao tratamento com DN. Segundo Simão; Chuffa; Camargo (2016) essa redução expressiva de corpos lúteos pode ser gerado pela ação desse andrógeno prejudicando a foliculogênese e luteogênese. É documentado também que os esteroides atuam na atresia e luteólise, ocasionando a redução ou ausência de corpos lúteos (GRACELI, 2005; CAMARGO et al., 2009; CALIMAN et al., 2017). Já no útero ocorreu a redução do lúmen (provocando uma aparência ramificada), mudanças no endométrio, miometria, hipertrofia das camadas uterinas e a intensa secreção luminal, são dados semelhantes aos apresentados por (GRACELI, 2005; MOBINI FAR, 2007; BELARDIN et al., 2014; CALIMAN et al., 2017),

A ausência de ciclicidade estral e redução dos níveis séricos hormonais foram constatados após o tratamento com o respectivo esteroide. Esse efeito pode estar relacionado a uma interrupção das funções neuroendócrinas, nos quais, altos níveis de testosterona alteram a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrogênio e progesterona, podendo ocasionar uma redução destes, fato observado na presente pesquisa (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985; GAO; SHORT, 1993; BRONSON; NGUYEN; ROSA, 1996; BLASBERG; LANGAN; CLARK, 1997). Como consequencia desta alteração

hormonal, pode-se observar a quebra da ciclicidade nas ratas androgenizadas persistindo assim, a fase do estro, enquanto que as dos grupos controle e controle veículo ciclavam normalmente como observado por Goldman et al., (2000).

As ratas tratadas com DN não chegaram a prenhez provavelmente devido à deficiência na foliculogênese, evidenciadas pela intensa atresia folicular e diminuição no número de folículos saudáveis nos diferentes estágios de maturação e desregulação no balanço hormonal resultando na falha na ovulação (SIMÃO; CHUFFA; CAMARGO, 2016; DIXON et al., 2014). É relatado que o uso de andrógenos agem inibindo a receptividade sexual em animais, resultando na deficiência de acasalamento e/ou infertilidade (MOBINI FAR et al., 2007), mesmo obtendo a confirmação da presença de espermatozoides através do esfregaço vaginal.

O IL-6 desempenha um papel importante no processo de maturação e implantação ovariana (XU et al., 2014), enquanto o TNF- α estimula e proliferam da células foliculares, regula o desenvolvimento folicular e do corpo lúteo (MACHELON et al., 1994). Já no útero, essas citocinas desempenham função na sua remodelação, principalmente no processo de implantação (SIERRA-MONDRAGÓN et al., 2015). No entanto, em situações de hiperadrogenismo o TNF- α tem a tendência de elevar seus níveis e, por conseguinte estimular a produção do IL-6 (SCAMBIA et al., 1994). A análise quantitativa das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 revelou aumento significativo nos ovários e úteros das fêmeas tratadas com nandrolona. Este fato pode estar associado ao potencial androgênico desse anabolizante, o que foi confirmado pelo estabelecimento do estro permanente observado nessas fêmeas, condição esta que, geralmente leva ao aparecimento de processos tumorais ovarianos (NILSSON; LANGLEY; FIDLER 2005; KULBE et al.,

2007; LO et al., 2011), disfunção uterina e complicações durante a implantação do embrião (CHIA et al., 2003; PICCHI et al., 2006; HAIDER et al., 2009). Isso demonstra que a nandrolona mesmo apresentando um moderado potencial androgênico (PERRY et al., 2005, SILVA et al., 2007) afeta a fisiologia ovariana e uterina por interferir na regulação do TNF- α e IL-6.

No ovário, a formação de vasos sanguíneos facilita o fornecimento de oxigênio, nutrientes e de hormônio. O folículo ovariano produz vários fatores angiogênicos, no entanto, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem papel primordial na regulação da angiogênese normal e anormal no ovário, e depende da quantidade e tamanho dos folículos antrais (KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK 2005). As fêmeas que receberam o tratamento com nandrolona apresentaram ovários com numerosos folículos antrais, o que poderia explicar a elevação do VEGF nesse órgão. De outra forma, podemos ainda supor que uma série de distúrbios do sistema reprodutor feminino está associada à alteração na angiogênese fisiológica, como por exemplo, a elevação do TNF α e IL-6, fato esse observado em nosso experimento nas ratas tratadas com nandrolona, os quais são reportados por induzir o aumento da expressão do RNAm do VEGF no ovário em condições patológicas (COHEN et al., 1996; KULBE et al., 2007; DUTTA et al., 2011). Entretanto, no útero das fêmeas tratadas com a nandrolona os níveis de VEGF foram significativamente reduzidos. A literatura relata que a expressão desse fator é, em parte, induzida pelo estrógeno no útero e colo uterino (MOWA; PAPKA, 2004; MOWA et al., 2004, 2008; LEE; SHERWOOD, 2005). Assim, essa redução pode ter sido devido ao fato dos esteroides interferirem no eixo hipotálamo-hipófise-ovários, (PURKAYASTHA; MAHANTA, 2012; BORDBAR et al., 2014), promovendo a redução do estrógeno circulante evidenciada neste trabalho.

Várias pesquisas tem demonstrado o efeito apoptótico de altas doses de EAAs no sistema nervoso central (ORLANDO et al., 2007; CUNNINGHAM; GIUFFRIDA; ROBERTS, 2009; TUGYAN et al., 2013; BASILE et al., 2013) e reprodutor masculino (KEENEY et al., 1990; GIAMPIETRI et al., 2005; SHOKRI et al., 2009). Segundo esses autores os andrógenos atravessam a membrana celular e ligam-se aos receptores androgênicos intracelulares induzindo o estresse oxidativo (CARACI et al., 2011), levando a disfunção mitocondrial e liberação do citocromo c que ativa a cascata de caspases promovendo a apoptose (CUNNINGHAM; GIUFFRIDA; ROBERTS, 2009). Isso poderia justificar os elevados índices apoptóticos evidenciados nos ovários e úteros das fêmeas tratadas com a nandrolona, sugerindo que esse anabolizante aumenta a vulnerabilidade desses órgãos ao processo de morte celular.

5 CONCLUSÃO

Assim conclui-se que os efeitos adversos da nandrolona no aparelho reprodutor feminino podem está relacionados à sua interferência na regulação das citocinas pró-inflamatórias e no processo apoptótico normal.

6. REFERENCIAS

ABRAHIN, O. S. C., SOUZA N.S.F., SOUSA E.C., MOREIRA J.K.R., NASCIMENTO V.C. Prevalência do uso e conhecimento de esteroides anabolizantes androgênicos por estudantes e professores de educação física que atuam em academias de ginástica. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 27-30, 2013.

956 ACEVEDO, P.; JORGE, J. C.; CRUZ-SÁNCHEZ, A.; AMY, E.; BARRETO-
 957 ESTRADA, J. L. A tenyear assessment of anabolic steroid misuse among
 958 competitive athletes in Puerto Rico. **The West Indian medical journal**, v. 60, n. 5, p.
 959 531, 2011.

960 ARALDI, R. P.; OLIVEIRA, D. G. D.; SILVA, D. F. D.; MENDES, T. B.; SOUZA, E. B.
 961 D. Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e
 962 da l-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. **Revista**
 963 **Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, p. 448-451, 2013.

964 BASILE, J.R.; BINMADI, N.O.; ZHOU, H.; YANG, Y.H; PAOLI, A.; PROIA, P.
 965 Supraphysiological doses of performance enhancing anabolicandrogenic steroids
 966 exert direct toxic effects on neuron-like cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.
 967 7, 69-78, 2013.

968 BELARDIN L.B, SIMÃO V.A., LEITE G.A.A, CHUFFA L.G.A.,CAMARGO I.C.C.
 969 DoseDependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone
 970 Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats. **Birth Defects Research Part B:**
 971 **Developmental and Reproductive Toxicology**. V.101, p.168-177, 2014.

972

973 BLASBERG M.E, LANGAN C.J, CLARK A.S. The effects of 17 - methyltestosterone,
 974 methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle.
 975 **Physiology Behavior**. v.61, p. 265–272, 1997.

976 BOFF, S. R. Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. *Revista*
 977 *Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 18, n. 1, p. 81-88, 2010.

978 BORDBAR H., MESBAH F., TALAEI T., DEHGHANI F., MIRKHANI H.. Modulatory
 979 effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a
 980 stereological study. **Iranian journal of medical sciences**. V.39, p. 44-50, 2014.

981 BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and**
 982 **Clinical Immunology**. v.11, n.2, p. 460-475, 2003.

983 BRAGA, M. A. Uso de testosterona como Esteróide. Trabalho de conclusão de
 984 curso; São Paulo; **Centro Universitário da Fundação de ensino Octávio Bastos**,
 985 2005.

986 BREUER, M. E.; MCGINNIS, M.Y.; LUMIA, A.R.; POSSIDENTE, B.P. Aggression in
 987 male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental
 988 provocation. **Hormones Behavior**, v. 40, P.409–18, 2001.

989 BRONSON F.H, NGUYEN K.Q, DE L.A ROSA J. Effect of anabolic steroids on
 990 behavior and physiological characteristics of female mice. **Physiology_Behavior**.
 991 v.59, p.49–55, 1996.

992 CALIMAN I.F., BERNABE C.S, MELO JR. A.F, BRASIL G.A., NASCIMENTO A.M.,
 993 LIMA E.M., FIGUEIREDO S.G., ANDRADE T.U., BISSOLI N.S. Long-term Treatment
 994 with Nandrolone Decanoate Impairs Mesenteric Vascular Relaxation in both
 995 Sedentary and Exercised Female Rats. **Steroids**. V.120,p. 7-18, 2017.

996 CAMARGO, I. C. C.; LEITE, G. A. A.; PINTO, T.; PAES, J. T. R. Histopathological
 997 findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration
 998 of synthetic steroids and nicotine. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66,
 999 n. 4, p. 195-202, 2014.

1000 CARACI, F.; PISTARA`, V.; CORSARO, A.; TOMASELLO, F.; GIUFFRIDA, M.L.;
 1001 SORTINO, M.A.; NICOLETTI, F.; COPANI, A. Neurotoxic Properties of the Anabolic
 1002 Androgenic Steroids Nandrolone and Methandrostenolone in Primary Neuronal
 1003 Cultures. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 4, p. 592–600, 2011.

1004 CARNEIRO-JÚNIOR, M. A.; SILVA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Nível de conhecimento e
 1005 ocorrência do uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Revista**
 1006 **Científica FAGOC-Saúde**, v. 1, n. 1, p.37-40, 2016.

1007 CHIA, S.; QADAN, M.; NEWTON, R.; LUDLAM, C.A.; FOX, K.A.; NEWBY, D.E. Intra-
 1008 arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation
 1009 and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans.
 1010 **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 23, p. 695–701, 2003.

1011 COHEN, T.; NAHARI, D.; CEREM, L.W.; NEUFELD, G.; LEVI, B.Z. Interleukin 6
 1012 induces the expression of vascular endothelial growth factor. **The Journal of**
 1013 **Biological Chemistry**, v. 271, p. 736-741, 1996.

1014 CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteroides
 1015 anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal**
 1016 **of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 165-179, 2004.

1017 CUNNINGHAM, R.L.; GIUFFRIDA, A.; ROBERTS, J.L. Androgens induce
 1018 dopaminergic neurotoxicity *via* caspase-3-dependent activation of protein kinase
 1019 Cdelta. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, 5539-5548, 2009.

1020 DIXON D., ALISON R., BACH U., COLMAN K., FOLEY G.L., HARLEMAN J.H.,
 1021 HAWORTH R., HERBERT R., HEUSER A., LONG G., MIRSKY M., REGAN K.,
 1022 ESCH E.V., WESTWOOD F. R., VIDAL J., YOSHIDA M. Nonproliferative and
 1023 proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Jornal of**
 1024 **Toxicologic Pathology**. v. 27, p. 1-107, 2014.

1025 DUTTA, S.; WANG, F.Q.; WU, H.S.; MUKHERJEE, T.J.; FISHMAN, D.A. The NF-
 1026 kappaB pathway mediates lysophosphatidic acid (LPA)-induced VEGF signaling and
 1027 cell invasion in epithelial ovarian cancer (EOC). **Gynecologic Oncology**, v. 123, n.
 1028 1, p. 129-37, 2011

1029 DVORAK H.F, BROWN L.F, DETMAR M, DVORAK A.M. Vascular permeability
 1030 factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and
 1031 angiogenesis **American Journal of Pathology**.;v.146, n. 5, p.1029-39, 1995.

1032 FERREIRA, L. O.; COUTO, B. P.; SZMUCHROWSKI, L. A.; DRUMMOND, M. D. M.
 1033 Efeitos Colaterais associados ao uso de Esteroides Anabolizantes Andrógenos Auto
 1034 Relatados por Praticantes de Musculação do sexo Masculino. **Revista Brasileira de**
 1035 **Ciências da Saúde**, v. 18, p. 35-42, 2014.

1036 FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M. S. A refined method for sequential blood
 1037 sampling by tail incision in rats **The international Journal of Laboratory Animal**
 1038 **Science and Welfare**. v.34, p.372-378, 2000.

1039 FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**.;v.267, n.
1040 16, p.10931-4, 1992.

1041 FORTUNATO, R.S; ROSENTHAL, D; CARVALHO, D.P. Abuso de esteróides
1042 anabolizantes e seu impacto sobre a função tireóidea. **Arquivos Brasileiros de**
1043 **Endocrinologia & Metabologia**, v.51, p.1417-24, 2007.

1044 FRIZON, F.; MACEDO, S. M. D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos
1045 anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e
1046 Passo Fundo/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n.
1047 3, p. 227-232, 2009.

1048 GAO Y, SHORT R.V. Use of an oestrogen, androgen or gestagen as apotential
1049 chemosterilant for control of rat and mouse populations, **Journal of Reproduction**
1050 **and Fertility**. v.97, p. 39–49, 1993.

1051 GIAMPIETRI, C.; PETRUNGARO, S.; COLUCCIA, P.; D’ALESSIO, A.; STARACE,
1052 D.; RICCIOLI, A.; PADULA, F.; PALOMBI, F.; ZIPARO, E.; FILIPPINI, A.; DE
1053 CESARIS, P. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. **Contraception**,
1054 v. 72, p. 298–302, 2005.

1055 GOLDMAN, J.M.; LAWS, S.C.; BALCHAK, S.K.; COOPER, R,L.; KAVLOK, R.J.
1056 Endocrine-disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual
1057 maturation an thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC
1058 recommendations, **Critical Reviews in Toxicology**.,v.30, p.135-196, 2000.

1059 GRACELI, J.B.; GAVA, P.L.; GOMES, H.L.; MOSCON, L.M.; ENDLICH, P.W.;
1060 GEREZ, J. R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. Histological assessment of ovaries and
1061 uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. **Contraception**, v. 72, n.
1062 1, p. 77-80, 2005.

1063 HAIDER, S.; KNÖFLER, M. Human tumor necrosis factor: physiological and
1064 pathological roles in placenta and endometrium. **Placenta**, v. 30, p. 111– 123, 2009.

1065 HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N.A. Medical issues associated with anabolic steroid
1066 use: are they exaggerated? **Journal of Sports Science and Medicine**. v. 5, p. 182-
1067 193, 2006.

1068 IP, E.J.; BARNETT, M.J.; TENEROWICZ, M.J.; KIM, J.A.; WEI, H.; PERRY, P.J.
 1069 Women and anabolic steroids: an analysis of a dozen users. **Clinical Journal of**
 1070 **Sport Medicine**, v. 20, n. 6, p. 475-481, 2010.

1071 IRIART, J.A.B.; CHAVES, J.C.; ORLEANS, R G. Culto ao corpo e uso de
 1072 anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 25,
 1073 p. 773-782, 2009.

1074 IRVING, L.M.; WALL, M.; NEUMARK-SZTAINER, D.; STORY, M. Steroid use among
 1075 adolescents: findings from Project EAT. **Journal of Adolescent Health**, v. 30, n. 4,
 1076 p. 243-252, 2002.

1077 KEENEY, D.S.; SPRANDO, R.L.; ROBAIRE, B.; ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L. Reversal
 1078 of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume:
 1079 number and proliferation in adult rats. **Journal of Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 47–
 1080 58, 1990.

1081 KICMAN A.T. Farmacologia de esteroides anabolizantes. **British Journal of**
 1082 **Pharmacol Ogy**. v. 104, p. 502-521, 2008.

1083 KOHLER, R.M.N., LAMBERT, M. I. Urine nandrolone metabolites: false positive
 1084 doping test? **Journal of Sports Science and Medicine**. v. 36, p. 325, 2002.

1085 KULBE, H.; THOMPSON, R.T.; WILSON, J.; ROBINSON, S.; HAGEMANN, T.;
 1086 FATAH, R.; GOULD, D.; AYHAN, A.; BALKWILL, F. The inflammatory cytokine TNF-
 1087 a generates an autocrine tumors-promoting network in epithelial ovarian cancer cells.
 1088 **Cancer Research**, v. 67, p. 585–592, 2007.

1089 LEE, E.S.; KIM, J.H.; IM,S.; LEE, K.B.; SOHN. S.; KANG, W.H. Application of
 1090 computerized image analysis in pigmentary skin diseases. **International Journal of**
 1091 **dermatology**. v. 40, p. 45-49, 2001.

1092 LEE, H.Y.; SHERWOOD, O.D. The effects of blocking the actions of estrogen and
 1093 progesterone on the rates of proliferation and apoptosis of cervical epithelial and

1094 stromal cells during the second half of pregnancy in rats. **Biology of Reproduction**,
1095 v. 4, p. 790–797, 2005.

1096 LO, C.W.; CHEN, M.W.; HSIAO, M.; WANG, S.; CHEN, C.A.; HSIAO, S.M.; CHANG,
1097 J.S.; LAI, T.C.; ROSE-JOHN, S.; KUO, M.L.; WEI, L.H. IL-6 trans-signaling in
1098 formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. **Cancer Research**,
1099 v. 71, p. 424–34, 2011.

1100 MACHELON, V; NOME, F.; SALESSE, R. Comparative IL-6 effects on FSH and
1101 hCG-induced functions in porcine granulosa cell cultures. **Cellular and Molecular**
1102 **Biology**, v. 40, p. 373-380, 1994.

1103 MANDL, A.M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Journal of**
1104 **Experimental Biology**. v. 28, p. 576-584. 1951.

1105 MOBINI FAR H.R., AGREN G., LINDQVIST A.S., MARMENDAL M., FAHLKE C.,
1106 THIBLIN I.. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate
1107 to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in
1108 reproductive capacity. **European Journal Obstetric Gynecology Reproductive**
1109 **Biology**. V. 131, p. 189-197, 2007.

1110 MOLDOVEANU, A.I.; SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. The cytokine response to
1111 physical activity and training. **Sports Medicine**., v. 31, n. 2, p. 115-144, 2001.

1112 MORAES, D.R.; CASTIEL, L.D.; RIBEIRO, A.P.P.G." Não" para jovens bombados,"
1113 sim" para velhos empinados: o discurso sobre anabolizantes e saúde em artigos da
1114 área biomédica. **Cadernos de saúde pública**, v. 31, p 1131-1140, 2015.

1115 MOWA, C.N.; JESMIN, S.; SAKUMA, I.; TOGASHI, H.; YOSHIOKA, M.; HATTORI,
1116 Y.; USIP, S.; PAPKA, R. Characterization of vascular endothelial growth factor
1117 (VEGF) in the uterine cervix over pregnancy: effects of denervation and implications
1118 for cervical ripening. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 52 1665–
1119 1674, 2004.

1120 MOWA, C.N.; LI, T.; JESMIN, S.; FOLKESSON, H.G.; USIP, S.E.; PAPKA, R.E.;
 1121 HOU, G. Delineation of VEGF-regulated genes and functions in the cervix of
 1122 pregnant rodents by DNA microarray analysis. **Reproductive Biology and**
 1123 **Endocrinology**, v. 6, p. 64-73, 2008.

1124 MOWA, C.N.; PAPKA, R.E. The role of sensory neurons in cervical ripening: effects
 1125 of estrogen and neuropeptides. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.
 1126 52 p. 1249–1258, 2004.

1127 NIDA – National Institute on Drug Abuse. Research report series: Anabolic steroid
 1128 abuse (2000) [Online]. U.S. **Department of Health and Human Services, National**
 1129 **Institutes of Health**. <http://www.nida.nih.gov/PDF/RRSteroi.pdf>

1130 NILSSON, M.B.; LANGLEY, R.R.; FIDLER, I.J. Interleukin-6, secreted by human
 1131 ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. **Cancer Research**, v.
 1132 65, p. 10794–10800, 2005.

1133 OBERHOLZER, M.; OSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRUHLMANN, M. Methods
 1134 in quantitative image analysis. **Histochem Cell Biol**. v. 105, p. 333-355, 1996.

1135 ORLANDO, R.; CARUSO, A.; MOLINARO, G.; MOTOLESE, M.; MATRISCIANO, F.;
 1136 TOGNA, G.; MELCHIORRI, D.; NICOLETTI, F.; BRUNO, V. Nanomolar
 1137 concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in
 1138 mixed mouse cortical cultures. **Brain Research**, v. 1165, p. 21-29, 2007.

1139 PASCHOAL M, MARQUETI RC, PEREZ S., SELISTRE-DE-ARAUJO S. Nandrolone
 1140 inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int Jornal Sports Med* , v.30, p.775-778, 2009.

1141 PATRÃO, M.T.C.C., SILVA, E.J.R., AVELLAR, M.C.W. Androgens and the male
 1142 productive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos**
 1143 **Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.8, p. 934-945 , 2009.

1144 PERRY, P.J.; LUND, B.C; DENINGER, M.J; KUTSCHER, E.C.; SCHNEIDER, J.
 1145 Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey and drug
 1146 utilization. **Clinic Journal Sport Medicine**. v. 15, p. 326-330, 2005.

1147 PICCHI, A.; GAO, X.; BELMADANI, S.; POTTER, B.J.; FOCARDI, M.; CHILIAN,
 1148 W.M.; ZHANG, C. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the
 1149 prediabetic metabolic syndrome. **Circulation Research**, v. 99, p. 69–77, 2006.

1150 PURKAYASTHA S., MAHANTA R. Effect of nandrolone decanoate on serum FSH,
 1151 LH and testosterone concentration in male albino mice. **World Journal of Life**
 1152 **Sciences and Medical Research**.v.2, p. 123-127, 2012.

1153 ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H. O uso de esteroides androgénicos
 1154 anabolizantes e outros suplementos ergogénicos—uma epidemia silenciosa. **Revista**
 1155 **Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 9, n. 2, p. 98-105,
 1156 2014.

1157 SANTOS, A.M. **O mundo anabólico**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.

1158 SCAMBIA, G.; TESTA, U.; PANICI, P.B.; MARTUCCI, R.; FOTI, E.; PETRINI, M.;
 1159 AMOROSO, M.; MASCIULLO, V.; PESCHLE, C.; MANCUSO, S. Interleukin-6 serum
 1160 levels in patients with gynecological tumors. **International Journal of Cancer**, v. 57,
 1161 p. 318–323, 1994.

1162 SHOKRI, S.; AITKEN, R.J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI,
 1163 F.M.; KASHANI, I.; EJTEMAEIMEHR, S.; AHMADIAN, S.; MINAEI, B.; NARAGHI,
 1164 M.A.; BARBARESTANI, M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone
 1165 deconoate increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic & Clinical**
 1166 **Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 324–330, 2009.

1167 SHOKRI, S.; AITKEN, R.J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI,
 1168 F.M.; KASHANI, I. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone deconoate
 1169 increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic and Clinical Pharmacology and**
 1170 **Toxicology**. v. 106, n. 4, p. 324-330, 2010.

1171 SIERRA-MONDRAGÓN, E.; GÓMEZ-CHÁVEZ, F.; MURRIETA-COXCA, M.;
 1172 VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, E.A.; MARTÍNEZ-TORRES, I.; CANCINO-DÍAZ, M.E.;

1173 ROJAS-ESPINOSA, O.; CANCINO-DÍAZ, J.C.; REYES-SÁNCHEZ, J.L.;
 1174 RODRÍGUEZ-MUÑOZ, R.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, S. Low expression of IL-6 and
 1175 TNF- α correlates with the presence of the nuclear regulators of NF- κ B, I κ BNS and
 1176 BCL-3, in the uterus of mice. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, Part A, p. 333-340,
 1177 2015.

1178 SILVA, P.R.P.; FIGUEIREDO, V.C.; CIOFFI, A.P.; PRESTES, M.C.;
 1179 CZEPIELEWSKI, M.A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de
 1180 musculação de Porto Alegre. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e**
 1181 **Metabologia**, v. 51, p. 104-110, 2007.

1182 SIMÃO V.A., CHUFFA L.G.A., CAMARGO I. C. C. Ovarian sex steroid receptors and
 1183 sex hormones in androgenized rats. **Reproduction**. v.152, p. 545-559, 2016.

1184 STRAUSS, R.H.; LIGGETT, M.T.; LANESE, R.R. Anabolic steroid use and perceived
 1185 effects in ten weight-trained **womwn athletes**. **JAMA**. v.253, p. 28871-2873, 1985.

1186 TEIXEIRA, A.A.C.; SIMOES, M.J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SOARES, J.J.M.
 1187 Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant
 1188 illumination rats. **International Journal of Morphology**. v. 22, p.189-194, 2004.

1189 THORLINDSSON, T.; HALLDORSSON, V. Sport, and use of anabolic androgenic
 1190 steroids among Icelandic high school students: a critical test of three perspectives.
 1191 **Substance abuse treatment, prevention, and policy**, v. 5, n. 1, p. 1, 2010.

1192 TUGYAN, K.; OZBAL, S.; CILAKER, S.; KIRAY, M.; PEKCETIN, C.; ERGUR,B.U.;
 1193 KUMRAL, A. Neuroprotective effect of erythropoietin onnandrolone decanoate-
 1194 induced brain injury in rats. **Neuroscience Letters**, v. 533, p. 28-33, 2013.

1195 WAGNER P.D. The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow.
 1196 **Biochemical Society Transactions**, v.39, p.1556-1559, 2011.

1197 WEINECK J. **Biologia do esporte**. 7 ed. São Paulo: Manole; 2005.

1198 WU, X.; CHENG, B.; CAI, Z. D.; LOU, L. M. Determination of the apoptotic index in
1199 osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. **Cancer Cell Int.**, v.
1200 13, n. 56, p. 1-4, 2013.

1201 ZANAROTTI, L.B. Avaliação do efeito do esteróide anabólico decanoato
1202 denandrolona na morfologia do ovário de ratas adultas. **Revista brasileira**
1203 **multidisciplinar** , v.20, p 84-91, 2012.

1204

Tabela 1. Média ($\pm$ desvio padrão) do peso das fêmeas e do útero e ovários.

Grupos	Peso Fêmeas (g)	Útero (g)	Ovários (g)
C	180,70 $\pm$ 4,27b	0,45 $\pm$ 0,02b	0,16 $\pm$ 0,01a
CV	186,00 $\pm$ 3,69b	0,47 $\pm$ 0,19b	0,14 $\pm$ 0,03a
TE	241,23 $\pm$ 5,63a	0,87 $\pm$ 0,03a	0,08 $\pm$ 0,05b

*Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

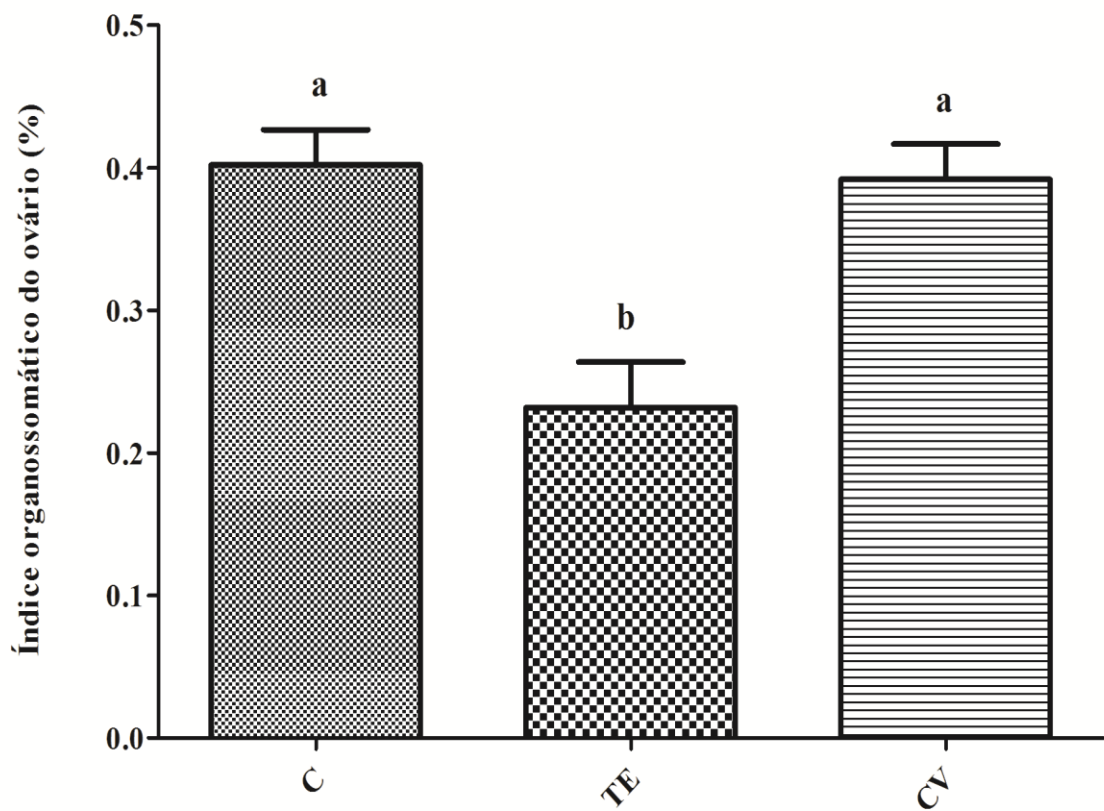


Figura 2. Índice organossomático do ovário. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

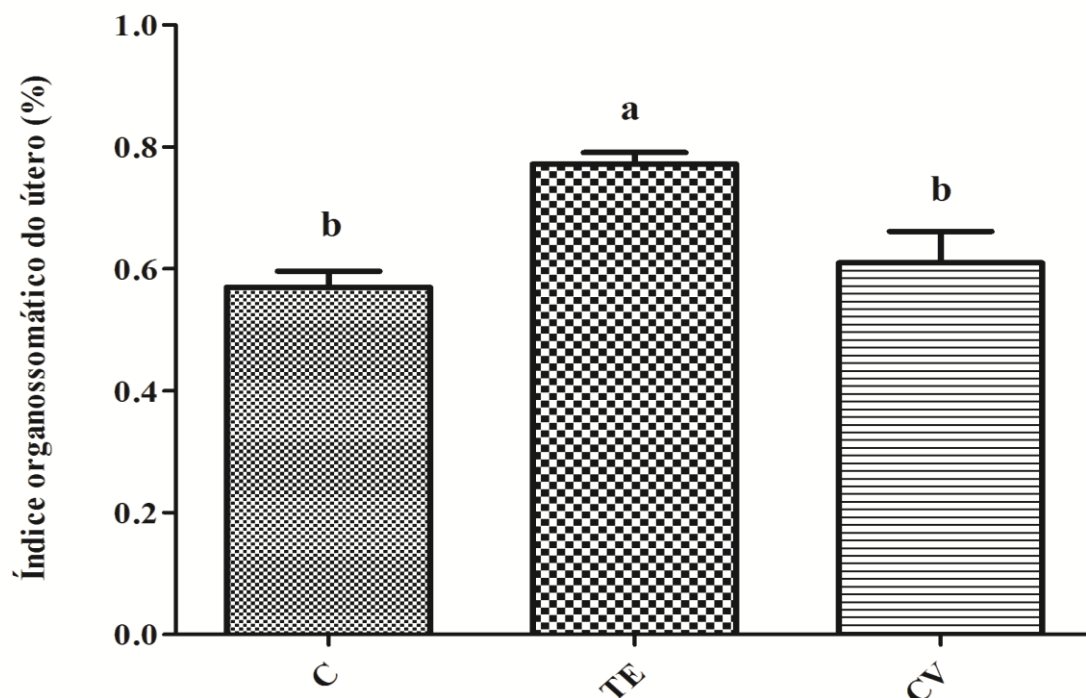


Figura 3. Índice organossomático do útero. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

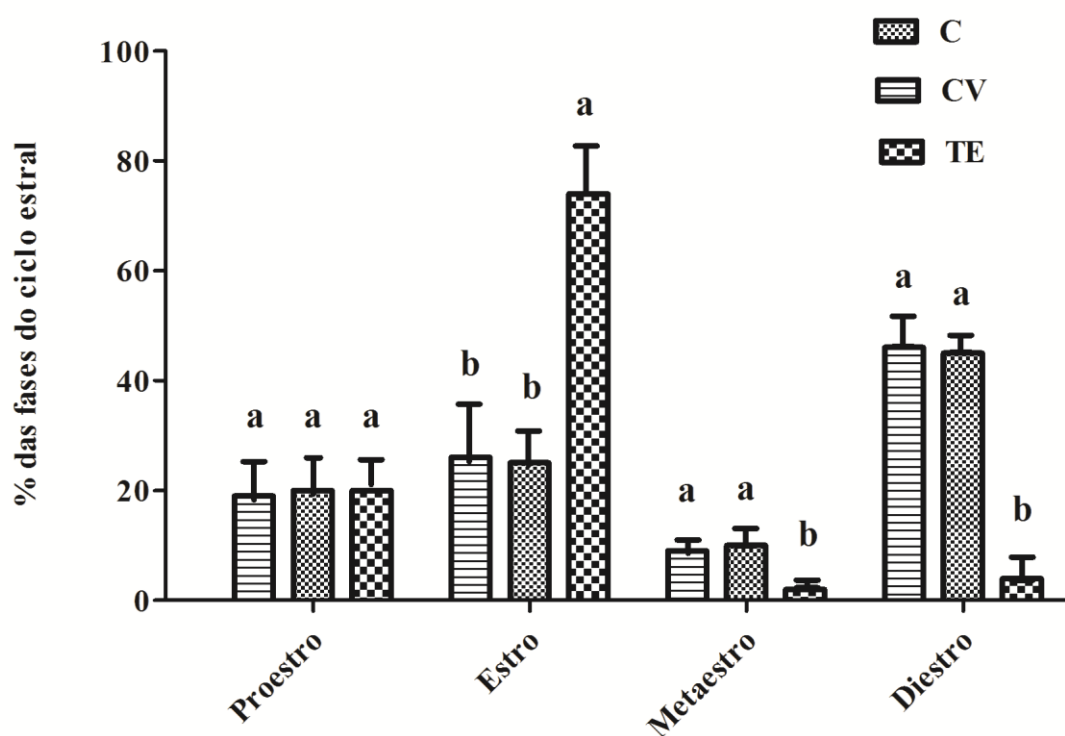


Figura 4. Medias do percentual das fases do ciclo estral das fêmeas dos grupos experimentais. Médias seguidas por letras diferentes, dentro das fases, diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

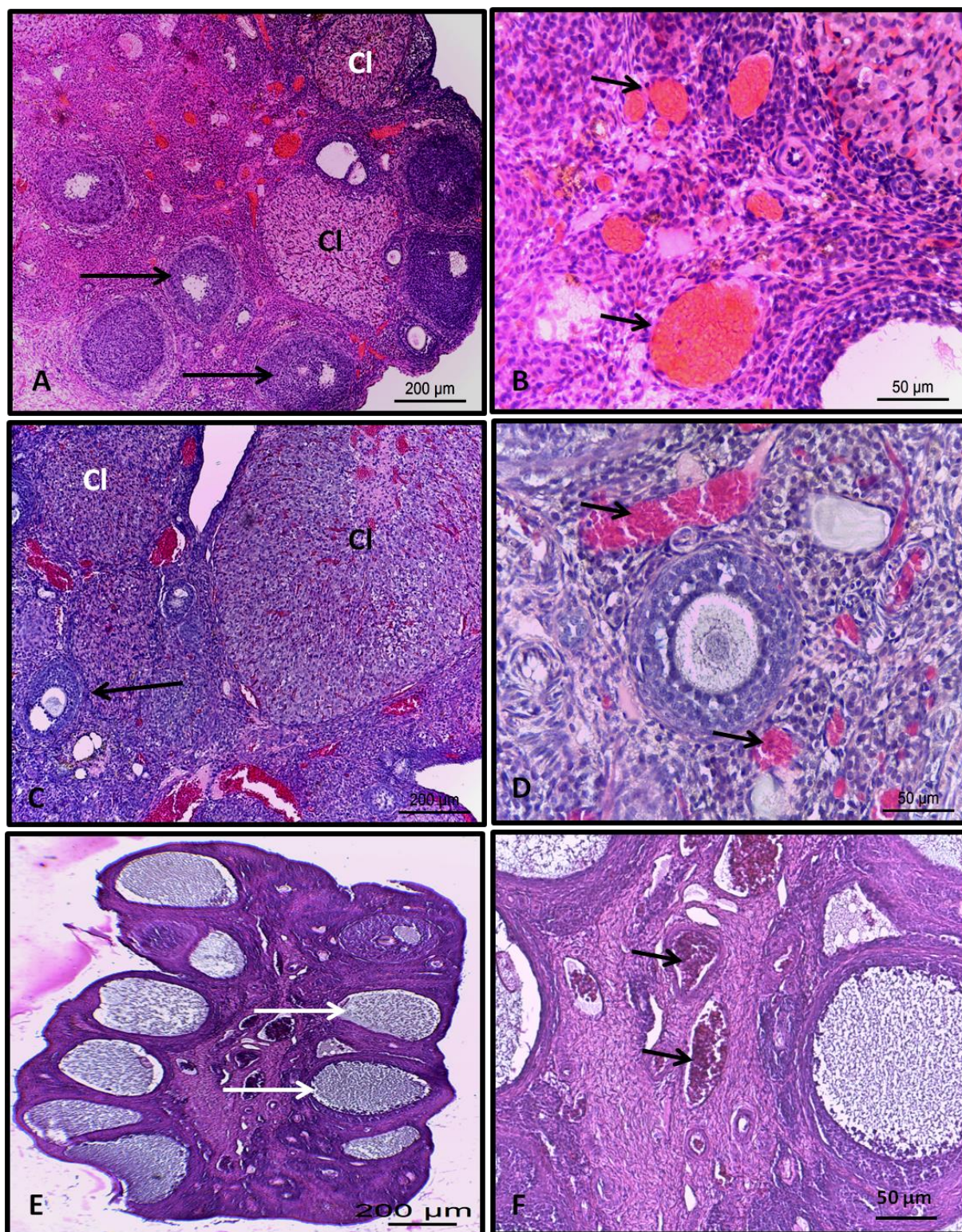


Figura 5: Ovários das ratas: (A) e (B) Grupo controle: Notar grande quantidade de corpos lúteos (Cl) e vários folículos ovarianos (setas longas), além da presença de vários vasos sanguíneos (seta curta). (C) e (D) grupo controle veículo apresentando semelhante ao grupo controle. (E) e (F) grupo tratamento esteroide presença de inúmeros folículos terciários (seta branca), ausência de corpos lúteos e presença de vasos sanguíneos na região medular (seta curta). Coloração H.E.

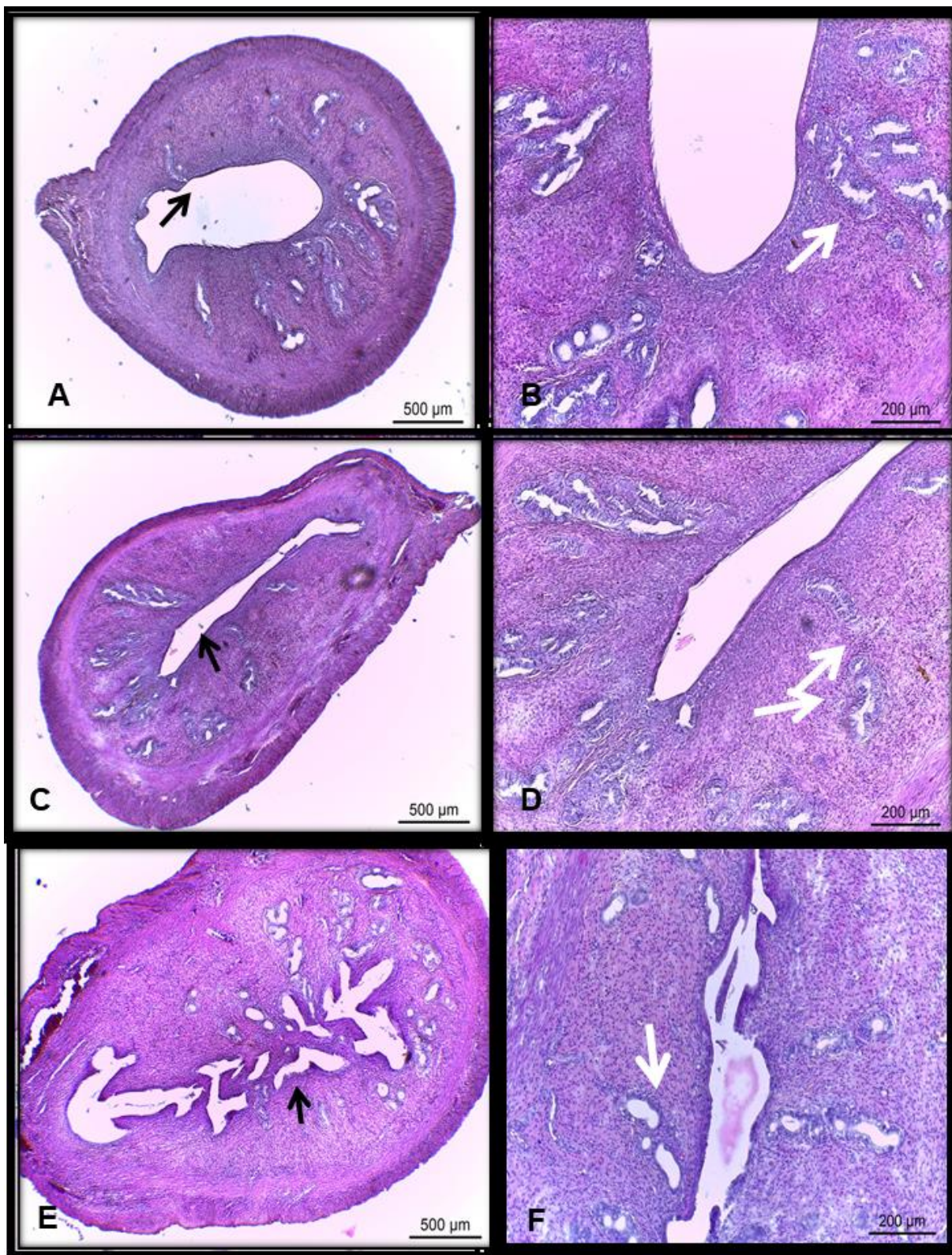


Figura 6: Útero das ratas: (A) e (B) grupo controle; (C) e (D) grupo controle veiculo: Notar útero sem alteração histológica. Lúmen uterino (seta preta), estroma com presença de glândulas endometriais (seta branca). (E) e (F) grupo tratamento esteroide: redução do lúmen uterino (seta preta) e glândulas endometriais dilatadas (seta branca). Coloração H.E.

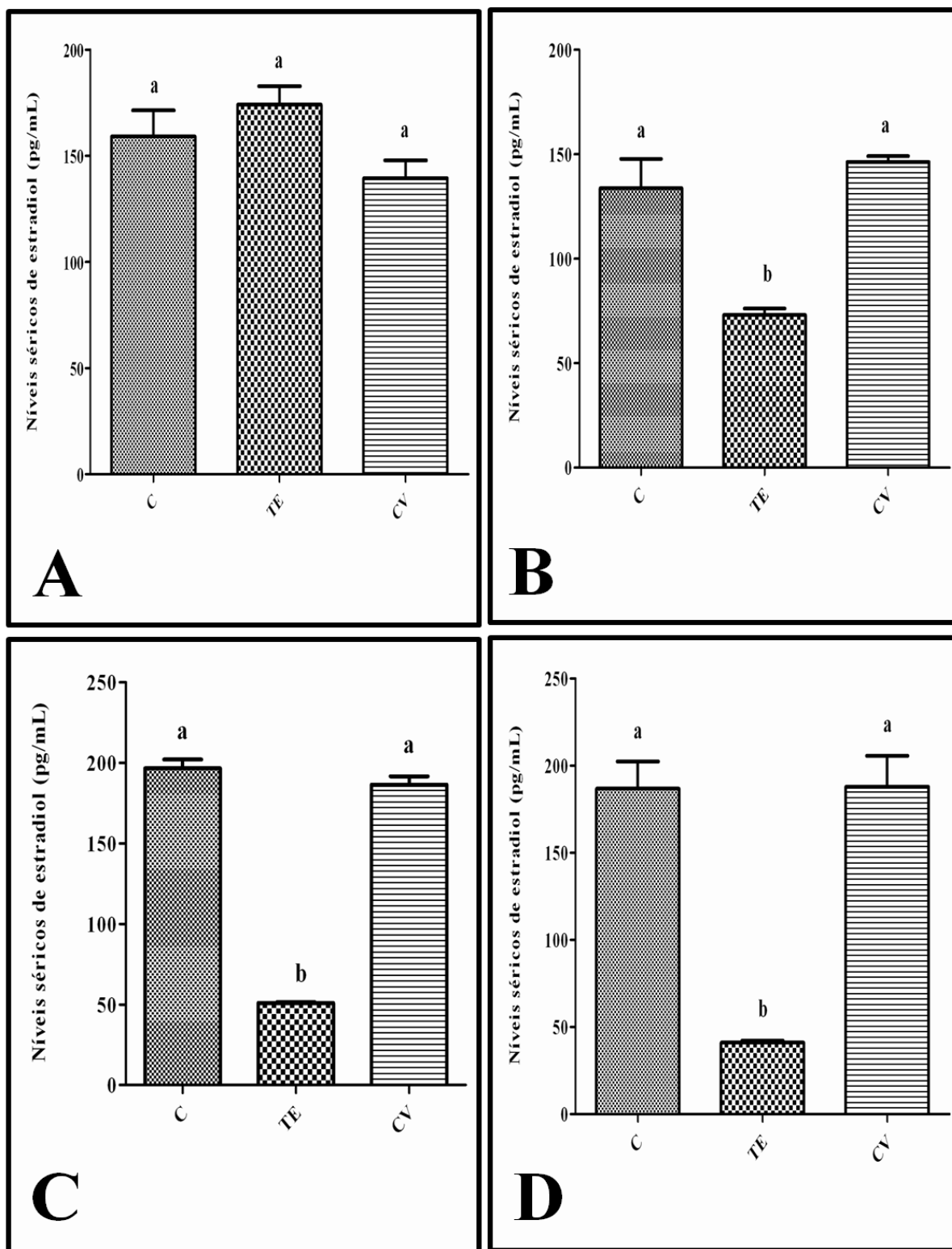


Figura 7. Níveis séricos do estrógeno nas ratas dos grupos experimentais. A: 60 dias, B: 70 dias, C: 80 dias e D: 90 dias. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney($P < 0,05$).

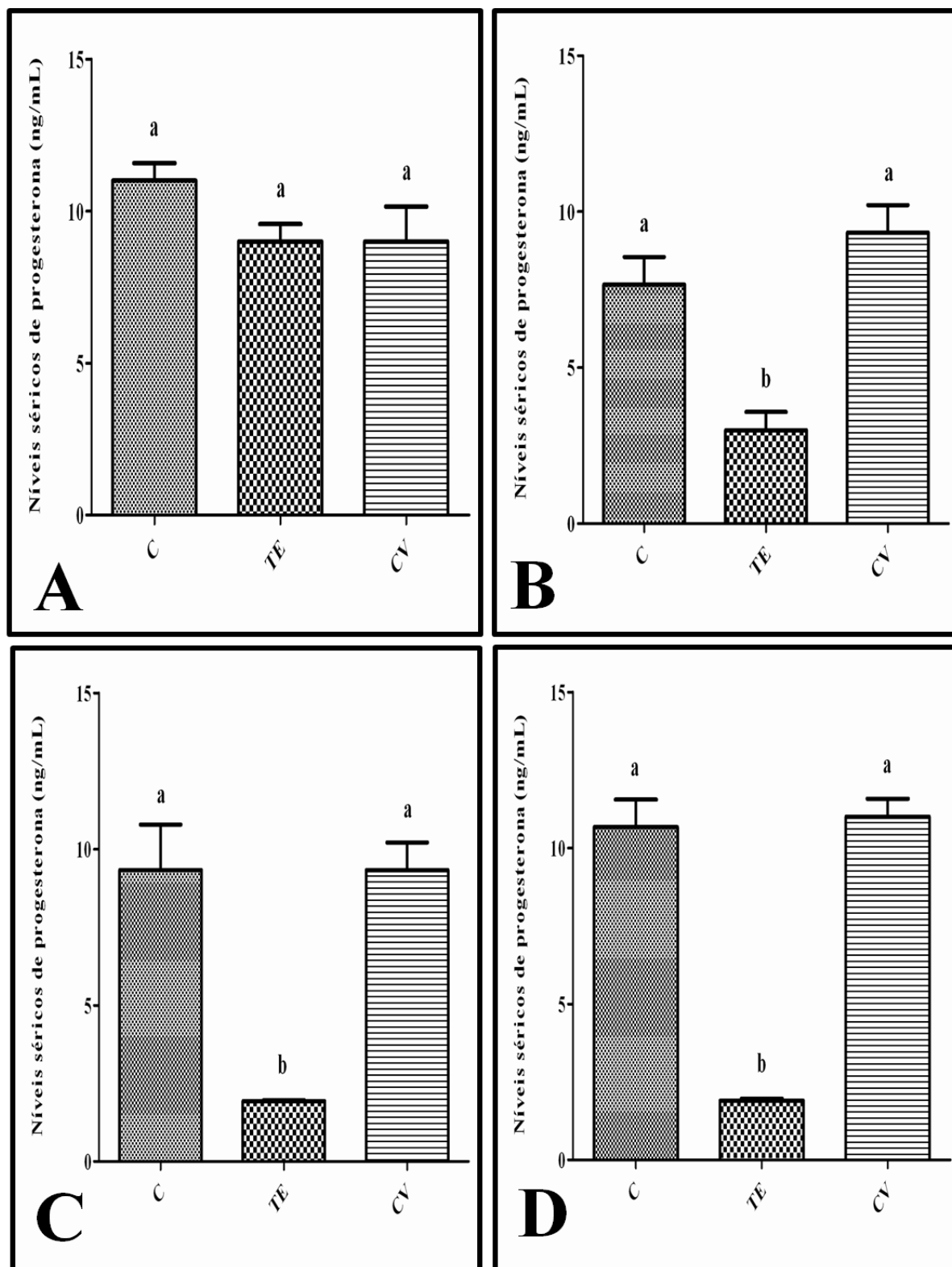


Figura 8. Níveis séricos de progesterona nas ratas dos grupos experimentais. A: 60 dias, B: 70 dias, C: 80 dias e D: 90 dias. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

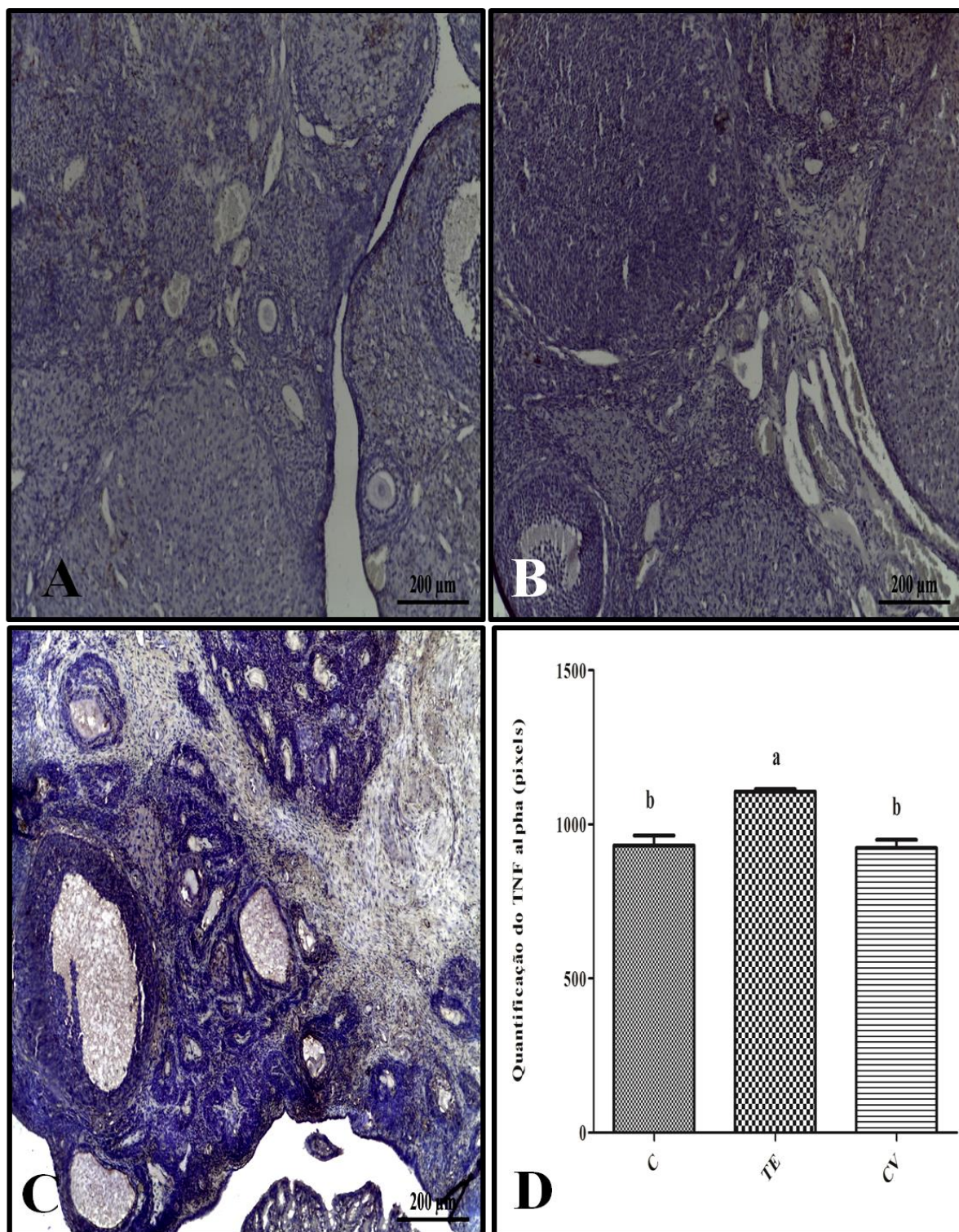


Figura 9. Quantificação da expressão do TNF α nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

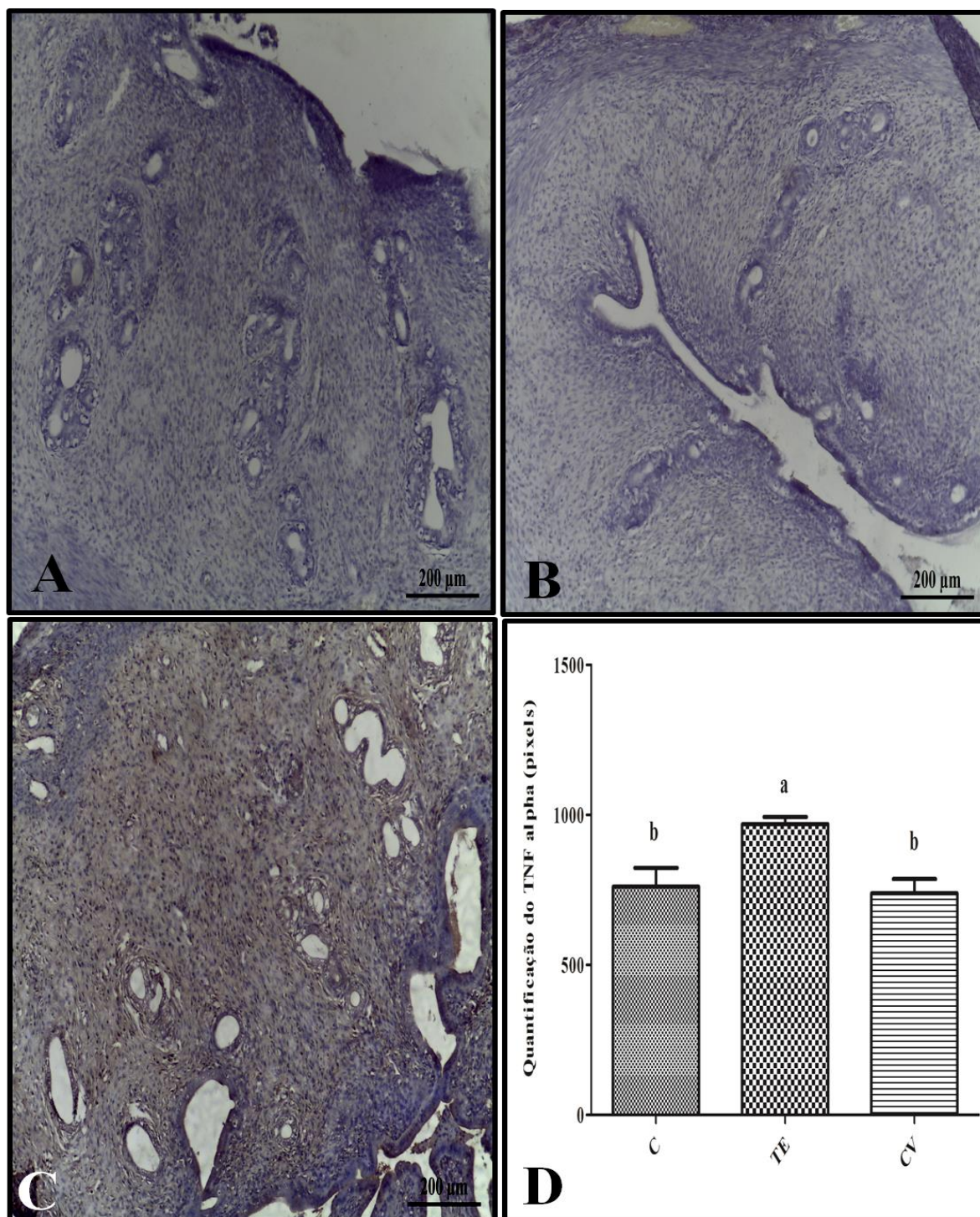


Figura 10. Quantificação da expressão do TNF α no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

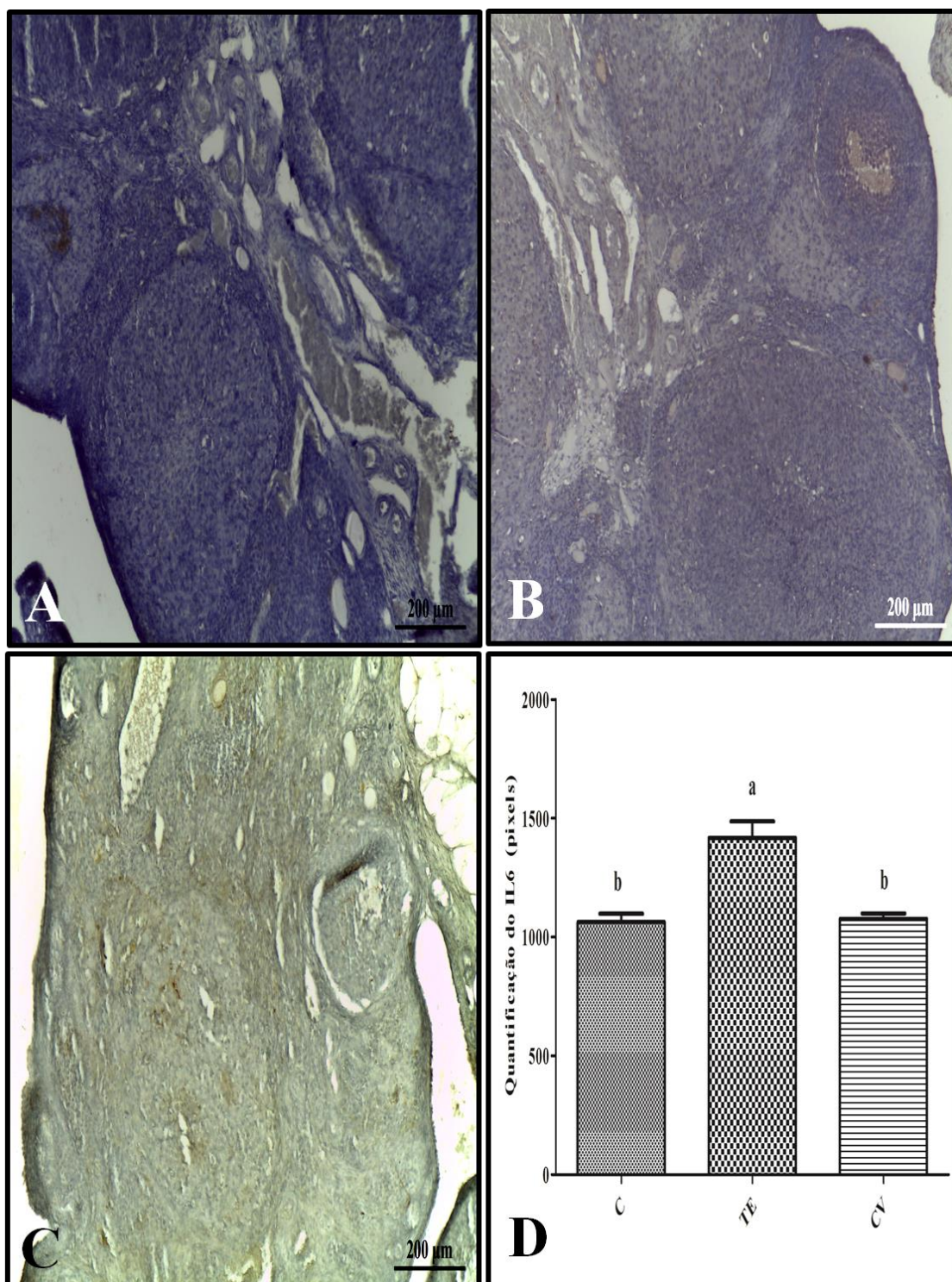


Figura 11. Quantificação da expressão do IL-6 nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

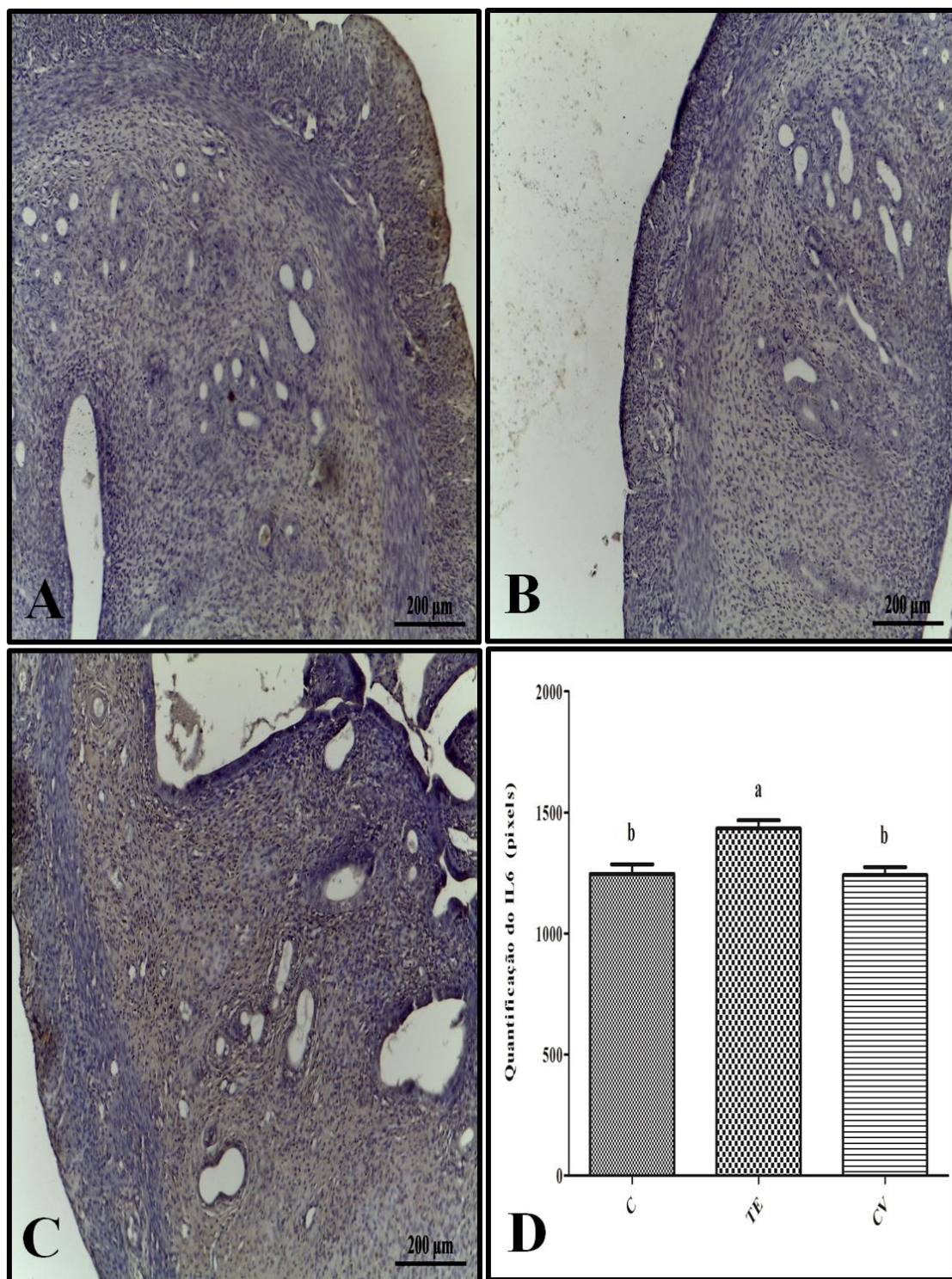


Figura 12. Quantificação da expressão do IL-6 no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)

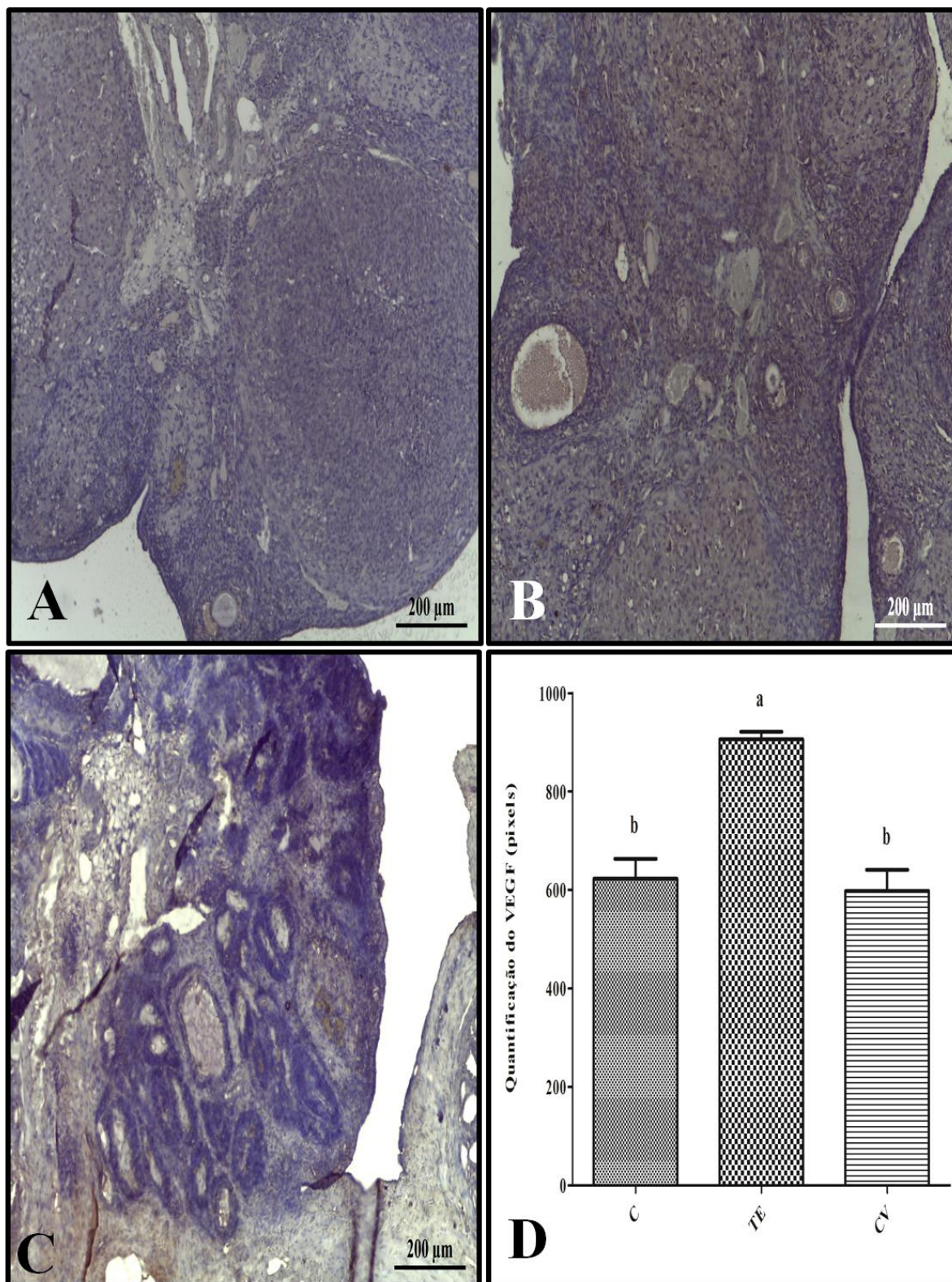


Figura 13. Quantificação da expressão do VEGF nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

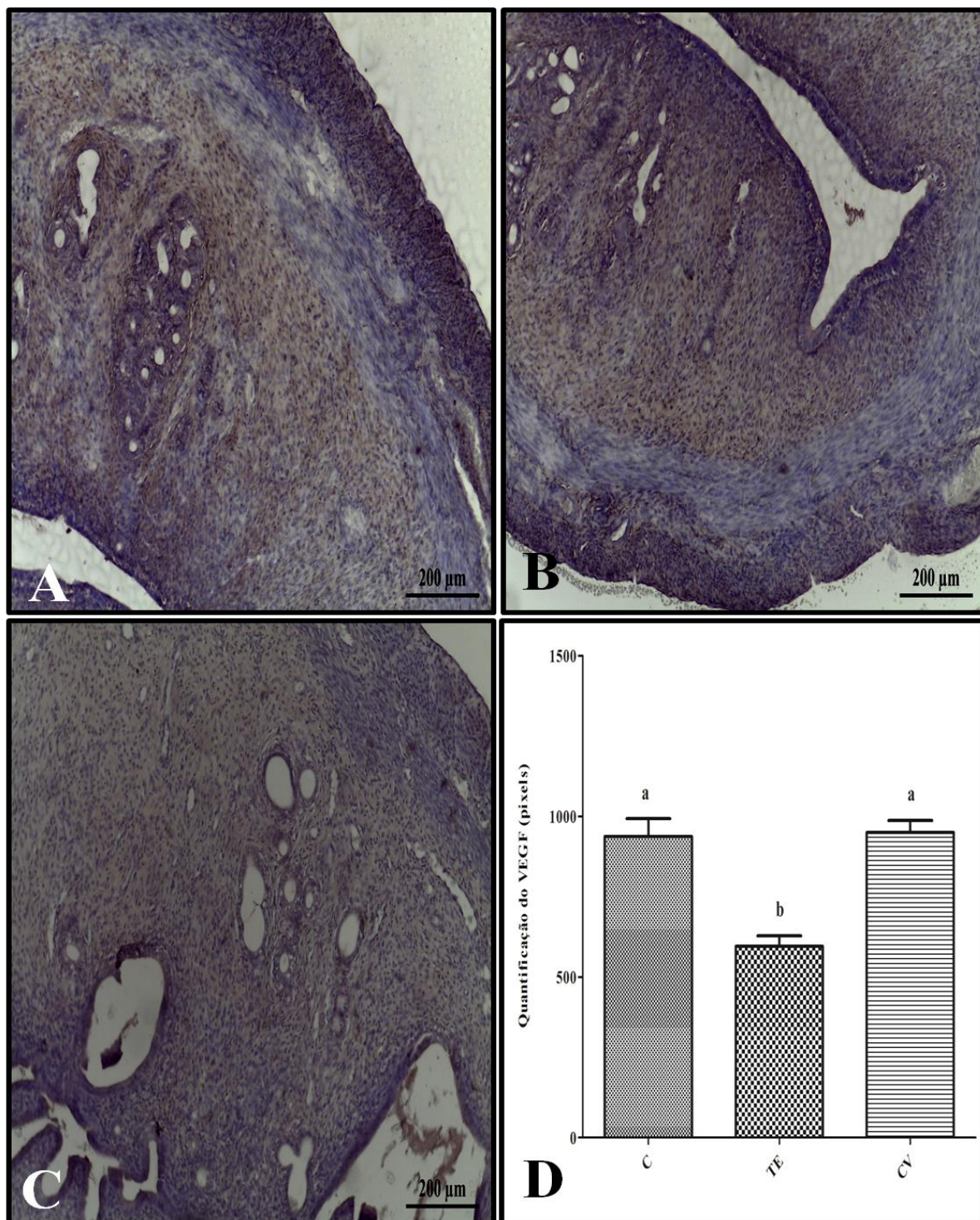


Figura 14. Quantificação da expressão do VEGF no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteróide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

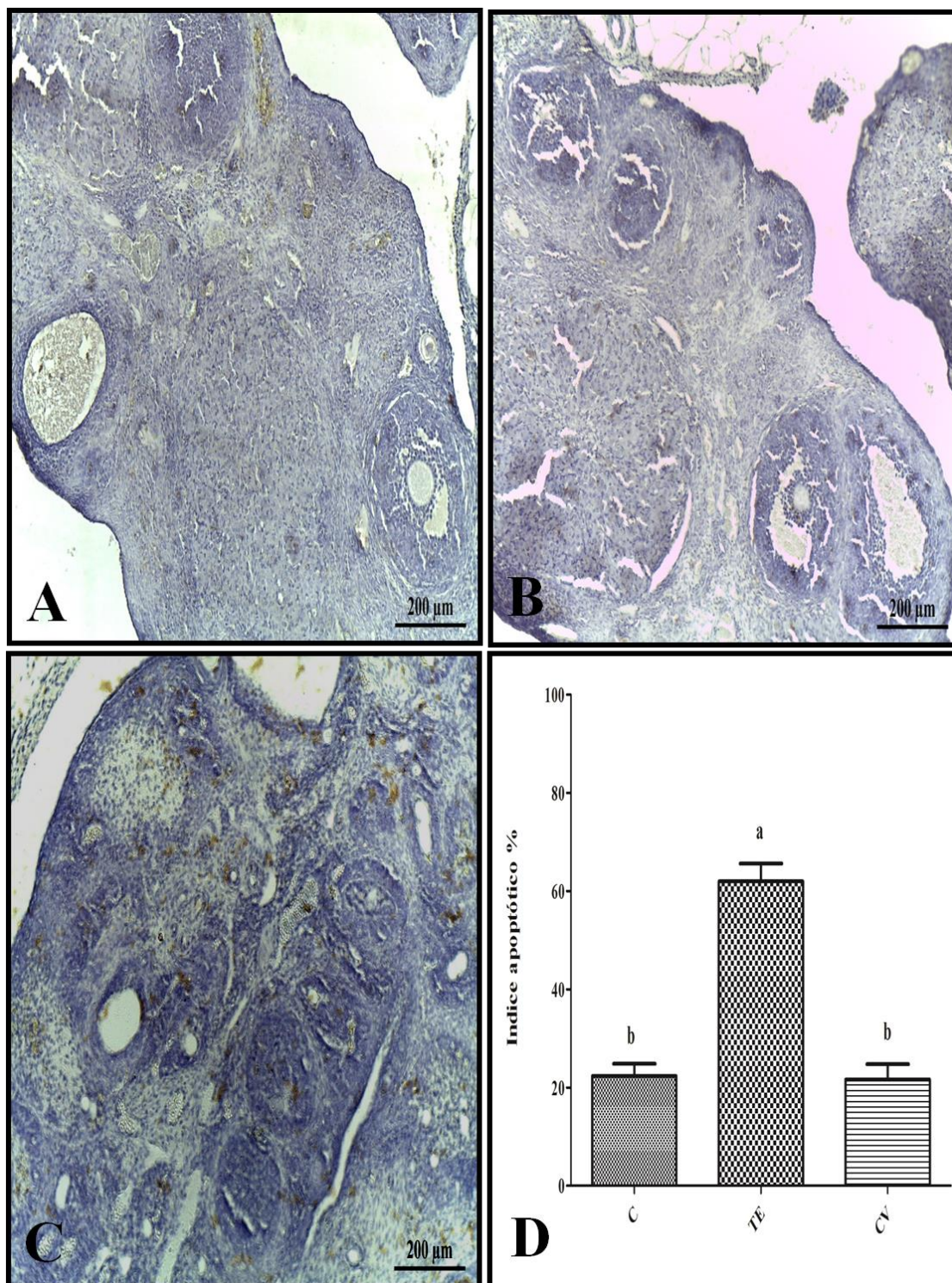


Figura 15. Índice apoptótico nos ovários das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

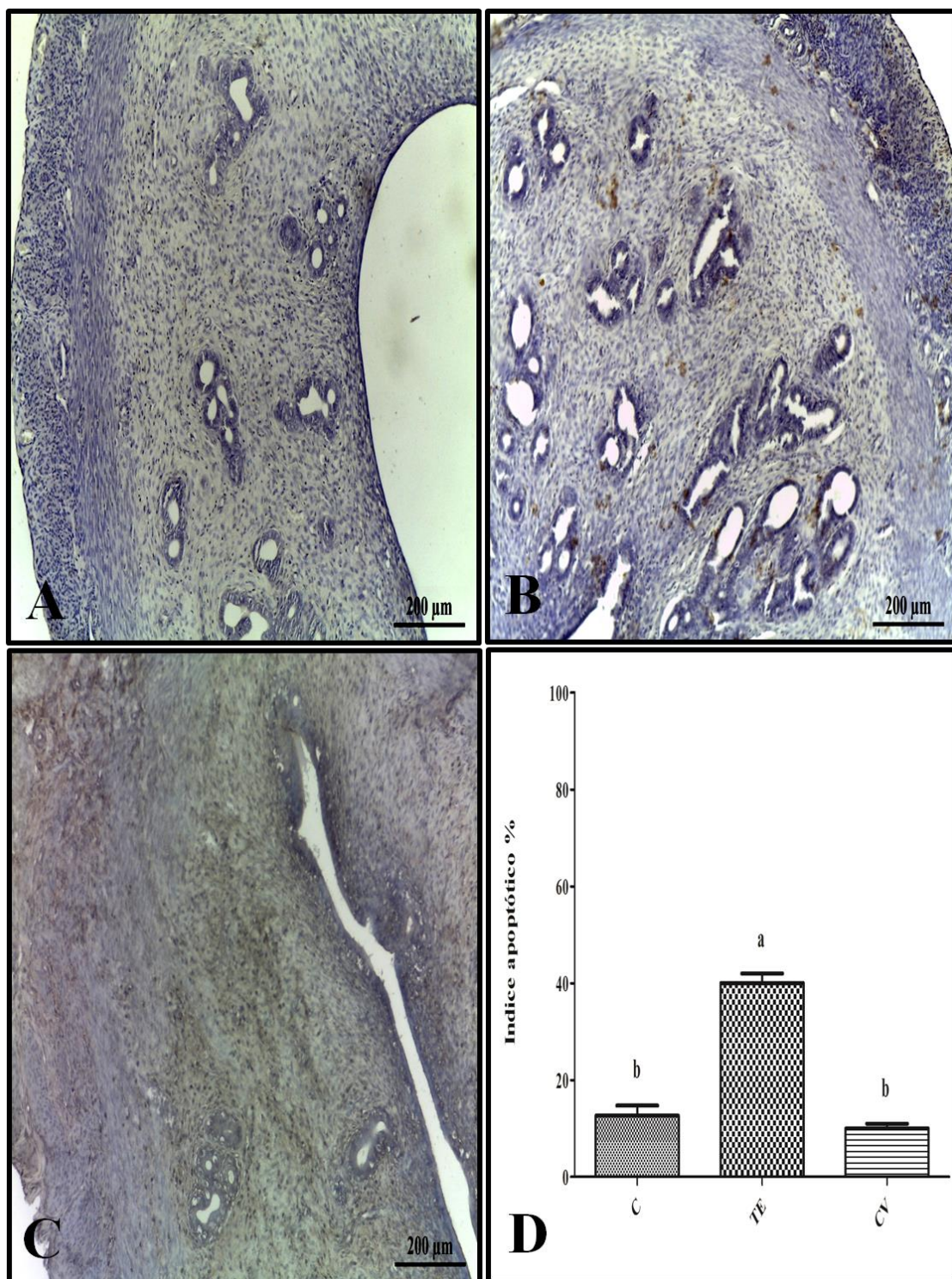


Figura 16. Índice apoptótico no útero das ratas dos grupos experimentais. A: Controle, B: Controle veículo, C: Tratado com esteroide. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

