

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Cibele Lima Lhamas

**EFEITOS DA BOLDENONA E DO ESTANAZOLOL ASSOCIADOS OU
NÃO À GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO FÍGADO E
TESTÍCULO DE RATOS**

Santa Maria, RS
2018

Cibele Lima Lhamas

**EFEITOS DA BOLDENONA E DO ESTANAZOLOL ASSOCIADOS OU NÃO À
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO FÍGADO E TESTÍCULO DE
RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS
2018

Cibele Lima Lhamas

**EFEITOS DA BOLDENONA E DO ESTANAZOLOL ASSOCIADOS OU NÃO À
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO FÍGADO E TESTÍCULO DE
RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária.

Aprovada em 10 de agosto de 2018:

Cynthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Andressa Bueno, Dra. (UFSM)

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Dr. (UFSM)

Jessié Martins Gutierrez, Dr. (UFCSPA)

Patricia Wolkmer, Dra. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Ao fim de quatro anos e mais alguns meses de Santa Maria, muitas pessoas passam pela minha mente com sentimento profundo de agradecimento. Tive a sorte de encontrar nessa jornada as pessoas que aqui deixo registradas:

Primeiramente à Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade por ter confiado em mim quando aceitou me orientar, pelo apoio nos momentos complicados e pelos bons momentos de aprendizado enquanto fui sua orientada. Espero que os frutos deste trabalho ainda nos renda realizações acadêmicas.

Ao co-orientador e amigo Fabiano Barbosa Carvalho por tudo que aprendi no Laboratório de Bioquímica e no Bio-Ox, pelas conversas e apoio ao longo deste projeto, pelas inúmeras ideias e soluções inteligentes, você é um pesquisador admirável.

À Andressa Bueno por partilhar da mesma linha de pesquisa e por ter vindo como uma “veterana” e me guiado nesse caminho da pós-graduação, por ter dividido aprendizado, estresses (oxidativos ou não) e amizade. Sem sua imensa ajuda não teria sido possível.

À estagiária Juliane Rosa pelos dias de manejo com os animais, ajuda nos dias de coleta e por ter sido tão dedicada. Você representa estagiários que, em algum momento, fizeram parte deste trabalho.

À Nathieli (Nathi) Biachin pelas longas conversas sobre protocolos, pesquisa, vida de pós-graduando e futuro. O que começou como uma grande ajuda, acabou se tornando amizade e agradeço por ter tido a chance de aprender com seu conhecimento indispensável.

Ao Roberto Marinho Maciel por ter confeccionado as lâminas histológicas com esmero e dedicação. Agradeço a disponibilidade e o conhecimento técnico que acrescentou a este trabalho.

Às meninas da Reprodução, Kalyne Bertolin e Alessandra Bridi, que se disponibilizaram a realizar a avaliação espermática de outro enfoque que esta tese se propôs e que ainda será aproveitado. Vocês auxiliaram sempre e foram muito prestativas nos dias de coleta.

À amiga e colega de LacVet, Ana Martiele Engelman que, embora não tenha participado diretamente nestes experimentos, esteve ao meu lado em muitos momentos de insegurança e foi um grande apoio moral ao longo dessa jornada. Espero retribuir a imensa ajuda prestada com a sua pesquisa.

À amiga Fernanda Valente por sempre me receber com o sorriso aberto e ter me ajudado num dos momentos mais difíceis desses quatro anos. Foi uma alegria ter participado da sua pesquisa.

Aos colegas do LacVet e Bio-Ox pelos momentos agradáveis enquanto pude aprender com vocês.

Aos animais deste estudo, meu respeito e reconhecimento.

Aos familiares, por terem compreendido os anos de ausência e por sempre terem sido o conforto para onde eu quis voltar. Em especial à Cíntia Lhamas, Maria Meire Lima Lhamas e Osmar Barbosa Lhamas, cada um à sua maneira, vocês foram mais importantes do que imaginam. Amo vocês imensamente.

À minha companheira felina, Penny.

À UFSM e ao PPGMV pela estrutura, instruções e por terem proporcionado um ambiente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao CNPq pelo financiamento com a bolsa de doutorado para que esse projeto fosse viabilizado.

Foi um caminho cheio de tropeços e aprendizado e, justamente por ter sido árduo, me sinto grata por ter podido crescer.

A JORNADA

(Mary Oliver)

*Um dia você finalmente descobriu
o que tinha de fazer e então começou,
mesmo que as vozes que te rodeavam
continuassem vociferando
péssimos conselhos –
mesmo que a casa inteira
começasse a estremecer
e você sentisse a velha fisgada
em seus calcanhares.
“Redima minha existência!”
clamaram as vozes.
Mas você não se deteve.
Sabia o que tinha de fazer,
mesmo que o vento o perseguisse
com seus dedos enrijecidos
com todas as suas forças,
mesmo que a melancolia por eles possuída
se mostrasse aterradora.
Já era tarde o suficiente,
e a noite, tempestuosa
e a estrada, repleta de galhos caídos
e pedras pelo caminho.
Porém lentamente,
ao deixar aquelas vozes para trás
as estrelas começaram a brilhar
através dos lençóis de nuvens,
e lá estava ocultada nova voz
que lentamente reconheceste como sua,
que se manteve em sua companhia
enquanto adentrava a passos largos
no mundo,
determinado a fazer
a única coisa que poderia fazer -
determinado a salvar
a única vida que poderia salvar.*

*“Demore o tempo que for para decidir o que
você quer da vida, e depois que decidir não recue
ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te
dissuadir.”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

EFEITOS DA BOLDENONA E DO ESTANAZOLOL ASSOCIADOS OU NÃO À GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NO FÍGADO E TESTÍCULO DE RATOS

Autora: Cibele Lima Lhamas
Orientadora: Prof^ª Dra Cinthia Melazzo de Andrade

Na presente tese verificamos, sob a forma de dois experimentos, os efeitos deletérios de Undecilenato de Boldenona (BOL) e Estanazolol (ES) no fígado e nos testículos de ratos. No primeiro experimento, os parâmetros inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo foram mensurados no fígado de ratos tratados com BOL ou ES. No segundo experimento, parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios foram avaliados nos testículos de ratos tratados com BOL associada ou não à gonadotrofina coriônica humana (hCG) em duas doses: 50U e 200U. No primeiro experimento, três protocolos foram estabelecidos a fim de se verificar qual deles seria o mais deletério para usuários desses tipos de anabolizantes. Sendo assim, o protocolo I representa os usuários que desejam acelerar os efeitos anabólicos usando doses superiores às recomendadas, em um intervalo de tempo mais curto, o protocolo II representa grupos de usuários de esteróides anabolizantes, que elegem uma dose moderada e tempo intermediário e protocolo III, que representa usuários que reduzem a dose e prolongam o tempo de exposição com o objetivo de diminuir os efeitos androgênicos. No segundo experimento, oito protocolos foram estabelecidos com o intuito de verificar se a exposição à BOL pode ser atenuada com o uso de hCG em duas doses consideradas baixas, mas que de acordo como são administradas, podem ter efeito de prevenção ou de reversão da lesão testicular. Sendo assim, o grupo I recebeu somente veículo de BOL; grupo II recebeu BOL e placebo de hCG na forma de ciclo; grupo III recebeu BOL e 3 aplicações de hCG50 na forma de ciclo; grupo IV recebeu BOL e 3 aplicações de hCG200 na forma de ciclo; grupo V recebeu BOL e 3 aplicações de hCG50 na forma de reversão; grupo VI recebeu BOL e 3 aplicações de hCG200 na forma de reversão; grupo VII recebeu BOL e 3 aplicações de hCG placebo na forma de reversão; grupo VIII recebeu BOL e foram mantidos sem aplicação de nenhuma substância até o tempo para que a espermatogênese completa ser alcançado (aproximadamente 60 dias). Para o primeiro experimento, os nossos resultados indicam que o protocolo I mostrou os efeitos mais deletérios no estado redox, marcadores de infiltração celular, bem como para o funcionamento metabólico do tecido hepático. Para o segundo experimento, nossos dados indicaram que o hCG teve efeitos benéficos tanto na dose de 50U como na dose de 200U ao se considerar o marcador MPO, contudo animais do protocolo VIII foram melhor beneficiados na avaliação de TBARS quando comparado aos animais que receberam o tratamento preventivo com hCG administrado em ciclos. A presente tese demonstra que diminuição da dose de anabolizantes pode ser menos deletéria ao fígado e que o hCG é capaz de prevenir infiltrado inflamatório nos testículos quando em uso com anabolizantes.

Palavras-chave: Undecilenato de Boldenona. Estanazolol. Fígado. Testículos. Estresse oxidativo. Marcador inflamatório. Gonadotrofina Coriônica Humana.

ABSTRACT

EFFECTS OF BOLDENONE AND STANAZOLOL ASSOCIATED OR NOT TO HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN IN LIVER AND TESTIS OF RATS

Author: Cibele Lima Lhamas
Advisor: Prof. Dr. Cinthia Melazzo de Andrade

In the present thesis, under the format of two experiments, the deleterious effects of Boldenone Undecylenate (BOL) and Stanazolol (ST) in rats' liver and testis were assessed. In the first experiment, the inflammatory, metabolic, and oxidative parameters were measured in rats' liver when treated with either BOL or ST. In the second experiment, oxidative stress and inflammatory parameters were evaluated in rats' testis treated with BOL associated or not to human chorionic gonadotrophin (hCG) in two dosages: 50U and 200U. In the first experiment, three protocols were established in order to verify which one would be the more deleterious for the users of this kind of anabolic steroids. Thereby, the protocol I represents the users who wish to accelerate the anabolic effects using higher dosages than those recommended, in a shorten time interval, the protocol II represents groups of users of anabolic steroids who choose a moderate dosage and intermediate time and protocol III represents users that reduce the dosage and prolong the exposure time aiming to reduce the androgenic effects. In the second experiment, eight protocols were made aiming to verify if the BOL exposure can be attenuated when using hCG in two dosages considered low, but in accordance to how they are administered, may have the reversion or prevention effect of the testicular damage. Therefore, the group I received only BOL vehicle; group II received BOL and hCH placebo in the cycle form; group III received BOL and three applications of hCG50 in the cycle form; group IV received BOL and three applications of hCG200 in the cycle form; group V received BOL and three applications of hCG50 in the reversion form; group VI received BOL and three applications of hCG200 in the reversion form; group VII received BOL and three applications of hCG placebo in the reversion form; group VIII received BOL and was kept with no applications of any substance until the whole spermatogenesis have finished (approximately 60 days). For the first experiment, our data indicate that the protocol I showed the most deleterious effects in the redox status, cellular infiltration markers, as well as for the metabolic functioning of the hepatic tissue. Concerning to the second experiment, our data indicate that hCG had beneficial effects either in 50U or 200U dosages considering the MPO marker, however the animals in the protocol VIII were better benefited in TBARS evaluation when compared to the animals that had the preventive treatment with hCG administered in cycle form. The present thesis demonstrates that decreasing the dose of anabolics may be less deleterious to the liver and that hCG is able to prevent inflammatory infiltrates in the testis when in use with anabolic steroids.

Keywords: Boldenone Undecylenate. Stanazolol. Liver. Testicles. Oxidative Stress. Inflammatory Marker. Human Chorionic Gonadotrophin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase
ATP	Adenosina trifosfato
BOL	Undecilenato de Boldenona
CAT	Catalase
COI	Comitê Olímpico Internacional
DHT	Diidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAA	Esteróide Androgênico Anabolizante
EHPG	Eixo Hipotalâmico-Pituitário-Gonadal
Epo	Eritropoietina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Estanazolol
FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
Hb	Hemoglobina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HGP	Hormônios glicoproteicos
HIAE	Hipogonadismo Induzido por Anabólicos Esteróides
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCL	Ácido Hidrocloroso
HRO ₂ [•]	Hidroperóxil
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malondialdeído
NAGase	N-acetil-beta-d-glucosaminidase
ND	Decanoato de Nandrolona
O ₂	Oxigênio
O ₂ [•]	Radical Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
RA	Receptor androgênico
RE	Receptor estrogênico
RO ₂ [•]	Peroxil
SH	Grupo sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
SOD-ex	Superóxido dismutase extracelular
T	Testosterona
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRT	Terapia de Reposição de Testosterona
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UI	Unidades Internacionais
VG	Volume globular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Testosterona: Perspectiva Histórica.....	12
2.2	Testosterona: Funções Biológicas.....	14
2.3	Esteroides Androgênicos Anabolizantes.....	16
2.3.1	Uso terapêutico dos esteroides androgênicos anabolizantes.....	19
2.3.2	Undecilenato de Boldenona.....	19
2.3.3	Estanazolol.....	21
2.4	Estresse Oxidativo e Mecanismos Antioxidantes.....	22
2.4.1	Estresse Oxidativo, Anabolizantes e o Testículo.....	25
2.5	Hipogonadismo Hipogonadotrópico Induzido por Esteroides Androgênicos Anabolizantes.....	26
2.5.1	Gonadotrofina Coriônica Humana no tratamento do Hipogonadismo Hipogonadotrópico Induzido por Anabolizantes.....	28
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	31
Artigo 1	Impacts of dose and time of boldenona and stanazolol exposure in the enzymatic antioxidant systems, myeloperoxidase and NAGase activities and glycogen and lactate levels in rat liver.....	32
Artigo 2	A Gonadotrofina Coriônica Humana previne a Peroxidação Lipídica Testicular Induzida pelo Undecilenato de Boldenona.....	58
4	DISCUSSÃO.....	72
5	CONCLUSÕES.....	75
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os prejuízos na função reprodutiva de homens que utilizam esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) já são bem descritos na literatura e algumas alternativas hormonais vêm sendo propostas com sucesso (RAHNEMA et al., 2014). O uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) em pacientes com azoospermia e o retorno de testosterona intratesticular a concentrações suficientes para iniciar e manter a espermatogênese normal já foram relatados (TUREK et al., 1995; COVIELLO et al., 2005). É importante estudar os efeitos da hCG na Medicina Veterinária, uma vez que o uso de esteroides androgênicos anabolizantes é uma realidade em animais, principalmente naqueles utilizados para finalidades esportivas, como a espécie equina. A continuação do uso de EAA nesses animais pode ser uma situação desejada pelo proprietário em conjunto com o clínico que acompanha o animal e, quando utilizada de forma adequada, proporciona resultados satisfatórios em relação ao ganho de massa muscular e desempenho em animais em treinamento. O uso de hCG em uma proposta de tratamento e/ou de prevenção pode se revelar promissor em manter a vida reprodutiva desses animais.

Além dos problemas reprodutivos, um enfoque ao fígado deve ser dado no contexto de uso e abuso de EAA, uma vez que o órgão é altamente suscetível ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ERO) (LI et al., 2015) e a avaliação de protocolos de tratamento com fontes de testosterona sintéticas é capaz de demonstrar qual tipo de protocolo pode ser mais prejudicial. Uma vasta gama de marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios pode ser utilizado e, dessa forma, um retrato do tipo de injúria ao qual o órgão é submetido e quais mecanismos de defesa o tecido hepático lança mão para que o mesmo possa continuar em funcionamento pode ser bastante fidedigno. Ademais, marcadores da atividade metabólica do órgão, tais como lactato e glicogênio são importantes ferramentas para se verificar a atividade do fígado diante de injúrias como no uso de EAA.

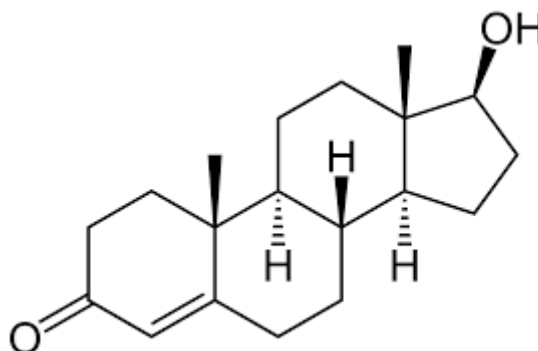
Desta forma, os objetivos da presente tese foram estudar os efeitos hepáticos causados pelo uso de dois esteroides androgênicos anabolizantes: Undecilenato de Boldenona e Estanazolol e verificar qual protocolo exerceu maiores danos e prejuízos ao tecido hepático; explorar aspectos referentes ao balanço oxidativo, mecanismos antioxidantes, marcadores inflamatórios e metabólicos agindo sobre o órgão diante do dano causado pelos hormônios esteroides sintéticos; investigar lesão oxidativa e inflamatória testicular em protocolos de abuso de Undecilenato de Boldenona, bem como elucidar os benefícios do uso da Gonadotrofina Coriônica Humana nesse contexto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Testosterona: Perspectiva Histórica

Os hormônios esteroides anabólicos são derivados químicos sintéticos da testosterona modificada com o intuito de melhorar a ação anabólica mais do que a androgênica (WYNN, 1975). A testosterona é um hormônio esteroide sintetizado no corpo humano a partir do colesterol (MILGROM, 1990). No sexo masculino, é produzida principalmente nas células testiculares de Leydig e em quantidade bastante inferior nas glândulas suprarrenais (DURDIAKOVA, OSTATNIKOVA; CELEC, 2011). É um hormônio que desempenha diferentes funções dependendo do estágio da vida. Durante a vida embrionária, a ação androgênica é central para o desenvolvimento do fenótipo masculino. Na puberdade, o hormônio é responsável pelas características sexuais secundárias que transforma meninos em homens. A testosterona também regula muitos processos fisiológicos no macho adulto incluindo metabolismo proteico muscular, funções cognitivas e sexuais, eritropoiese, níveis lipídicos plasmáticos e metabolismo ósseo (WILSON; GRIFFIN, 1980) (Figura 1).

Figura 1- Estrutura molecular da testosterona, hormônio esteroide, inclui núcleo de colesterol lipossolúvel e cadeia lateral de hidróxido polar.



Fonte: Saudan et al., 2006.

As circunstâncias pelas quais um fazendeiro neolítico na Ásia Menor descobriu que a castração de animais melhorava sua domesticação nunca serão conhecidas, mas os efeitos da testosterona e sua fonte primária foram claros por, pelo menos, 6.000 anos (FREEMAN, BLOOM; MCGUIRE, 2001). Assim como pensadores clássicos, incluindo Aristóteles, Hipócrates, Lucrécio, Celso e Galeno tentaram estabelecer como os processos biológicos funcionavam na saúde e na doença, uma base humoral da função biológica deve ter parecido lógica e realista. Um órgão específico baseado no excesso desses humores encaixou-se bem

no paradigma humoral. Após a castração, todos os tipos de outras manipulações foram aplicados no intuito de se corrigir as desproporções e desequilíbrios humorais, tais como dieta, uso de laxantes, mudança de clima e sangrias até o século XIX (FREEMAN et al., 2001).

Em 1849, Arnold Berthold (1801-1863) tinha as vantagens da ciência do século XIX para fazer uma ligação entre as mudanças fisiológicas e comportamentais da castração e uma substância secretada pelos testículos (BERTHOLD, 1849). Em galos, esta técnica rotineiramente produziu a regressão da crista e da barbela. Ao se retornar os testículos de galos castrados para a cavidade abdominal, Berthold descobriu que a regressão característica não ocorreu. Uma vez que os testículos retirados não estavam mais conectados aos nervos, ele concluiu que os testículos deveriam afetar as características comportamentais e sexuais ao secretar uma substância para a corrente sanguínea (FREEMAN et al., 2001).

Charles Edouard Brown-Séquard (1817-1894), um neurologista britânico, investigou a patologia endócrina por várias décadas. Seu estudo de 1856 sobre os efeitos da extirpação das glândulas adrenais em animais foi um marco histórico (JAY, 1999). Ele se convenceu de que em adição aos testículos, a tireoide, adrenais, pâncreas, fígado, baço e rins continham secreções que poderiam ser úteis no tratamento de doenças (HAAS, 1998). Brown-Séquard atraiu ainda mais interesse no meio científico sobre o conteúdo dos testículos com sua famosa auto-experimentação. Em junho de 1889, Brown-Séquard relatou que teve um aumento na sua força física, habilidades mentais e apetite após a auto-injeção de um extrato derivado dos testículos de cães e porquinhos-da-índia (BROWN-SÈQUARD, 1889). Embora nunca comprovada, essa reivindicação levou pesquisadores ao redor do mundo a buscar um novo campo de organoterapia injetando derivados testiculares e transplantando testículos de humanos ou de animais em pacientes para tratar epilepsia, tuberculose, diabetes, paralisia, gangrena, anemia, arteriosclerose, gripe, doença de Addison, histeria e enxaqueca (HOBERMAN; YESALIS, 1995).

A partir desses estudos durante o século XIX e início do século XX, um neologismo passa a ser utilizado entre fisiologistas na busca da definição da palavra “hormônio” (STARLING, 1905; LECHAGO, 1987). A primeira metade do século XX é marcada pela exploração de procedimentos cirúrgicos como a “operação de Steinach” - um fisiologista que estudou os efeitos rejuvenescedores da vasoligação em animais mais velhos. Outro cirurgião, o suíço Paul Niehans, utilizou a técnica da “terapia celular” como uma substituição ao transplante de órgãos, tendo descrito a técnica como “um método de tratamento de todo o

organismo em uma base biológica, capaz de revitalizar o organismo humano com trilhões de células trazendo para ele as células embrionárias ou jovens das quais necessita.” (NIEHANS, 1960). Embora tenha trabalhado com uma grande variedade de preparações endócrinas, a maior parte do trabalho de Niehans focou nas secreções testiculares.

Esses estudos e terapias que já vinham sendo realizados incitou a ansiedade da indústria farmacêutica no sentido de capitalizar a popularidade da organoterapia apesar de sua eficácia duvidosa. A competição resultou em uma corrida entre três equipes de pesquisadores no sentido do isolamento do hormônio testicular (FREEMAN, BLOOM; MCGUIRE, 2001). Adolf Butenandt, um estudante de química da Universidade de Marburg, influenciado pelo trabalho de seu professor, Aor Windaus (1876-1959) sobre o colesterol, começou a explorar os hormônios sexuais. Windaus, professor de química na Universidade de Göttingen, recebeu o prêmio Nobel de Química de 1928 pelo seu trabalho com esteroides e vitaminas. Butenandt isolou o primeiro hormônio sexual puro, estrona, em 1929 a partir da urina de mulheres grávidas. Ele então isolou 15 mg de uma substância pura a partir de uma grande quantidade de urina de um homem (TAUSK, 1984; KOCHAKIAN, 1993; DAINTITH, 1999). Além disso, esse pesquisador identificou este produto como androsterona (andro = macho, ster = esterol; one = cetona) e apresentou sua descoberta no encontro químico de Hamburgo em outubro de 1931 (BUTENANDT; HANISCH, 1935). Suas ideias sobre a estrutura da androsterona foram confirmadas em 1934 quando Leopold Ruzicka (1887-1976), um químico de Zurique sintetizou o hormônio (FREEMAN, BLOOM; MCGUIRE, 2001).

2.2 Testosterona: Funções Biológicas

Testosterona biologicamente sintetizada é produzida nas células de Leydig nos testículos, glândulas adrenais e outros sítios periféricos. Uma série de enzimas converte a cadeia lateral no C-17 do precursor de colesterol para um grupo hidroxil, transfere uma dupla ligação do C-6 para o C-4 e oxida o grupo hidroxil no C-3 para um grupo carbonil (VOET; VOET, 1995). A secreção é controlada por um mecanismo de *feedback* negativo envolvendo o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), hormônios trópicos sintetizados pela glândula pituitária anterior. Como todos os hormônios esteroides, a testosterona estimula a síntese de proteínas específicas atravessando a membrana celular e se ligando a um receptor no núcleo, ativando genes particulares. A produção de testosterona (T) começa cedo no desenvolvimento do feto humano e determina a diferenciação sexual durante

um “período sensível” no 3º ou 4º mês de gestação (KALAT, 1998).

A T atua nas células alvo por meio de um metabólito ativo, a diidrotestosterona (DHT), a qual é convertida localmente por uma enzima. A T e a DHT se ligam ao receptor andrógeno (RA). Outro metabólito hormonal metabolicamente ativo da T é o estradiol que se liga ao receptor estrogênico (RE). Por seu caráter lipofílico, a T e outros esteroides atravessam as membranas biológicas muito facilmente. No ambiente intracelular há formação do complexo hormônio-receptor, através de uma ligação específica, que depende das características químicas de cada esteroide. Os andrógenos ligam-se aos RA citoplasmáticos e tal ligação é acompanhada da interação dos complexos resultantes com sítios nucleares e efeitos genômicos subsequentes. Estas ações caracterizam a via denominada “via clássica” de ação dos hormônios esteroides. Existe ainda outra via de sinalização destes hormônios denominada “via rápida”, que pode ocorrer independentemente da ligação aos RA. O efeito rápido dos hormônios esteroides consiste basicamente na alteração da fluidez da membrana plasmática (FALKENSTEIN et al., 2000; CATO; NESTL; MINK, 2002; KICMAN, 2008).

A T possui efeitos protetores em alguns tecidos e tem se observado que quando administrada em doses excessivas, os efeitos passam a ser tornar deletérios. Um exemplo disso é o que ocorre com o músculo cardíaco, exibindo um efeito protetor substancial nos cardiomiócitos ao inibir a apoptose e fibrose cardíaca através de vários mecanismos de ação atuantes em níveis moleculares e celulares (ALTIERI et al., 2016). A administração de T possui uma função anti-isquêmica protetora significativa no tecido miocárdico de cobaias e de humanos (BORST et al., 2010), bem como no coração após isquemia/reperfusão (PONGKAN, CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2015). Além disso, a T possui um efeito protetor na mitocôndria. A função da mitocôndria danificada diminui a produção de ATP enquanto aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DUTTA et al., 2012), como observado no envelhecimento cardíaco (BIANCHI, 2018). Em ratos castrados, a indução de um infarto do miocárdio causou uma alteração grave nas estruturas mitocondriais levando à apoptose dos cardiomiócitos e comprometimento da função cardíaca (WANG et al., 2015).

A apoptose dos cardiomiócitos e o estresse oxidativo são reduzidos pela regulação positiva da testosterona e fosforilação da proteína quinase B no mioblasto cardíaco (IKEDA et al., 2010). A T inibe a formação de ERO em níveis plasmáticos fisiológicos, contudo, em níveis suprafisiológicos, possui um efeito oposto ao reduzir a formação de óxido nítrico e aumentar o estresse oxidativo no âmbito celular (SKOGASTIERNA et al., 2014) e disfunção

mitocondrial como observado em leucócitos durante a indução transexual de mulheres para homens (VICTOR et al., 2014).

É reconhecido que os hormônios andrógenos possuem um efeito eritrogênico no sistema hematológico (SHAHIDI, 1973). Elevações nos níveis de hemoglobina (Hb) e volume globular (VG) são frequentemente descritos como consequências da terapia de reposição de testosterona (TRT) (TENOVER, 1992) e meta-análises recentes têm confirmado que mudanças no perfil sanguíneo são os efeitos colaterais mais comuns observados nesse tipo de terapia (CALOF et al., 2005; FERNÁNDEZ-BALSELLIS et al., 2010). Tem sido proposto que a elevação a longo prazo da Hb e do VG pode aumentar o risco de venotromboembolismo, mas essa hipótese não é universalmente aceita até então (SCHREIJER, REITSMA; CANNEGIETER, 2010).

Logo após a descoberta dos efeitos eritrogênicos da T, pesquisadores propuseram que a explicação para as respostas hematológicas observadas se devia a um aumento na produção de eritropoietina (Epo) pelos rins (SHAHIDI, 1973). Logo em seguida, um efeito mais direto foi revelado quando culturas de medula óssea humana expostas a T acarretaram aumentos significativos nas colônias eritroides (PALACIOS et al., 1983). Apesar disso, Bachman e colaboradores (2014) revelaram um sistema multicomponente para explicar os efeitos eritrogênicos desse hormônio. Assim como foram observadas elevações nos níveis de eritropoietina (Epo) durante a terapia de reposição de testosterona (TRT), também se verificou que o metabolismo de ferro e sua disponibilidade foram significativamente alterados durante sua administração. Além disso, hepcidina, um peptídeo sintetizado no fígado e que promove o sequestro de ferro (FLEMING, 2008) diminuiu em 49% durante um estudo que utilizou TRT em homens, enquanto que a reabsorção de ferro - usada como um indicador de atividade eritropoietica - foi marcadamente aumentada durante esse tipo de terapia (JONES et al., 2015). Esse fato explica o aumento do parâmetro Hb em indivíduos recebendo terapia de reposição com testosterona (T).

Dessa forma, é proposto que um efeito sinérgico entre esses 4 componentes – estímulo à Epo, estímulo às colônias eritroides, diminuição na produção de hepcidina e aumento na disponibilidade de ferro – ocorra e que sejam os responsáveis por causar os aumentos observados na hemoglobina e hematócrito de indivíduos com maiores níveis de testosterona.

2.3 Esteroides Androgênicos Anabolizantes

Esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) são moléculas sintéticas derivadas do hormônio T, modificadas quimicamente com o objetivo de aumentar a meia-vida do princípio e seu efeito anabólico, além de minimizar o efeito androgênico (SHAHIDI, 2001).

Logo após a testosterona ter sido isolada em 1935, descobriu-se que, quando administrado oralmente, esse hormônio é praticamente inativado. Isso ocorre porque, após a ingestão oral, o hormônio é absorvido pelo intestino delgado e passa via veia porta para o fígado onde é rapidamente metabolizado, principalmente para compostos inativados (NIESCHLAG et al., 1975; COERT et al., 1975). A descoberta da testosterona levou à síntese dos esteroides anabolizantes e modificações químicas desta molécula têm sido úteis farmacologicamente para alterar a potência relativa anabólico-androgênica, diminuir a taxa de inativação, bem como mudar o padrão de metabolização (HANDELSMAN, 2000).

Os registros de uso de substâncias que aumentam a capacidade física e proporcionam vantagem competitiva ao usuário, denominado dopagem, data do século XIX, quando ciclistas europeus utilizaram estimulantes como a heroína, cocaína e anfetamina nos jogos olímpicos. Somente em meados de 1935 é que a estrutura química da molécula de T foi isolada, e a partir daí disponibilizada em forma oral e injetável para uso terapêutico em humanos. Na década de 1940, estudos em equinos evidenciaram melhora no desempenho dos animais que faziam uso dessa molécula. Na próxima década, a utilização se estendeu aos atletas olímpicos americanos, soviéticos e alemães (KOCH, 2002). O uso abusivo dos esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) por atletas de elite se difundiu entre 1950 e 1960 nos países do leste europeu, coincidindo com o término da Segunda Guerra Mundial e com o crescimento da indústria farmacêutica (HANDELSMAN; HEATHER, 2008).

Em razão desse contexto, o Comitê Olímpico Internacional (COI) determinou que se estabelecessem testes que comprovassem a administração dessas substâncias por parte dos competidores e seu uso passou a ser rotineiro a partir dos jogos de Munique em 1972 passando a ser conhecido como exame antidopagem. Foi somente em 1976 que esses testes passaram a detectar a presença de EAA e começaram a integrar o exame antidopagem em Seul no ano de 1988 (BOWERS, 2002).

Após algumas décadas, os EAA deixaram de ser consumidos somente pela elite desportiva e passaram a ser utilizados pela população em geral (EVANS-BROWN; MCVEIGH, 2008). Atualmente, o aumento ao redor de 30% do comércio destes fármacos para fins não terapêuticos tornou-se um problema de saúde pública (EVANS, 2004). Em resposta ao aumento do consumo destas substâncias, à fabricação clandestina e comércio

ilegal, em 1991 os EAA foram classificados como substâncias de uso controlado pelo congresso norte americano (SHAHIDI, 2001; SJÖQVIST, GARLE; RANE 2008). Também no Brasil o uso de EAA é considerado dopagem desde 1985 pelo decreto de uma portaria do Ministério da Educação e sua comercialização sem receituário médico é considerado tráfico de entorpecentes e é crime segundo o Código Civil.

Existem três principais classes de EAA e elas determinam o anabolismo e androgenicidade dos fármacos que as compõe (CLARK; HENDERSON, 2003). A primeira classe é representada por compostos injetáveis (propionato e cipionato de testosterona), onde a esterificação retarda a degradação do composto e prolonga o tempo de ação devido à liberação sistêmica mais lenta, além de possuir maior afinidade pelos RA do que a T (SHAHIDI, 2001; BASARIA, WAHLSTROM; DOBS, 2001; HALL; HALL, 2005). A segunda classe é também formada por compostos injetáveis, como o decanoato de nandrolona (ND) e o undecilenato de boldenona (BOL), que sofreram um alongamento de sua cadeia, conferindo uma atividade androgênica reduzida resultante de uma redução da afinidade da molécula aos RA (WINTERS, 1990; SHAHIDI, 2001). Na terceira classe as moléculas, que inclui o estanozolol (ES), sofreram um processo de alquilação, que dificulta a metabolização hepática, e torna possível a administração via oral e redução drástica do potencial androgênico (BASARIA, WAHLSTROM; DOBS, 2001).

Estes compostos são usados para melhorar a força e resistência atlética em animais domésticos como caninos e equinos, com objetivo de incremento da massa muscular por meio da produção de proteínas com equilíbrio positivo no balanço de nitrogênio e estimulação de sua produção, além de diminuição da degradação proteica (KICMAN, 2008).

Essas moléculas também são utilizadas por atletas ou não-atletas para fins atléticos ou estéticos, sendo que a dose utilizada supera em 10 a 100 vezes a dose terapêutica e esse abuso acarreta muitos efeitos adversos (YERSALIS; BAHRKE, 1995; MCGINNIS, 2004; LUMIA; MCGINNIS, 2010). Quase todos os principais tecidos do corpo possuem RA e, por essa razão, são alvos dos EAA que conseqüentemente sofrem os efeitos de seu abuso (KARILA, HOVATTA; SEPPÄLÄ, 2004).

Segundo GRAHAM e colaboradores (2008), os efeitos psicológicos parecem ser as únicas conseqüências adversas de uma overdose aguda por EAA, mas a administração por longos períodos leva a um distúrbio no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal com conseqüente supressão dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Tal supressão pode resultar em infertilidade, atrofia testicular (em machos) e distúrbios no ciclo

menstrual e amenorreia secundária (em fêmeas).

2.3.1 Uso terapêutico dos Esteroides Androgênicos Anabolizantes

As indicações terapêuticas clássicas para o uso de EAA incluem principalmente o hipogonadismo, múltiplas causas de falência da medula óssea, deficiências na mineralização óssea e algumas desordens que provocam perda muscular (SHAHIDI, 2001). Os efeitos deletérios do abuso dessas substâncias incluem insuficiência hepática, acne, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL), adenoma hepático, alterações de humor, comportamento agressivo e tendência ao suicídio, bem como déficits de aprendizagem e memória espacial (CLARK, HARROLD; FAST, 1997; BOYADJIEV et al., 2000; TANEHKAR et al., 2013).

Diversos grupos de pesquisadores estudaram o papel dos EAA como promotores de crescimento testicular; glândula bulbouretral e próstata (GROOT; BIOLATTI 2004; CANNIZZO et al., 2007), na função reprodutiva de garanhões (SQUIRES et al., 1982; SQUIRES; MCKINNON, 1987; GARCIA et al., 1987) e no desempenho reprodutivo de coelhos (THABET et al., 2010). Em homens que fizeram uso abusivo de EAA, há uma notável redução nos níveis de testosterona sérica, bem como de FSH e de LH. Estudos afirmaram que o hipogonadismo hipogonadotrópico está relacionado a essa redução de testosterona sérica e morfologia anormal do testículo. (JAROW; LIPSHULTZ, 1990, TOUSSON et al., 2012). Além disso, tem sido associada ao uso de anabolizantes, com redução da qualidade espermática e que pode estar relacionada com a infertilidade (TORRES-CALLEJA et al., 2001).

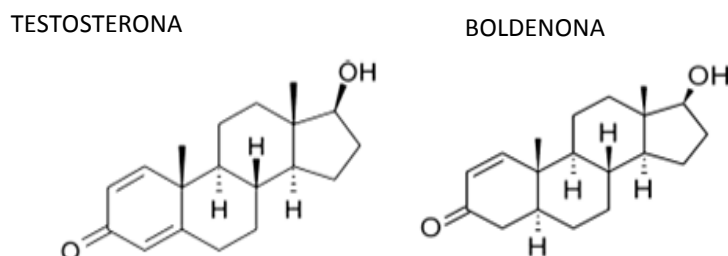
A capacidade dos anabolizantes alterar a histopatologia testicular levando a lesões que dependem tanto da molécula administrada como também da dose já está descrita em diversas literaturas que relataram detalhadamente essas alterações, que em via de regra diminuem o epitélio germinativo e, por consequência, os espermatozoides viáveis culminando com a oligospermia e/ou azoospermia e consequente infertilidade (GROOT; BIOLATTI 2004; ODA; EL-ASHMAWY, 2012; TOUSSON et al., 2012; TOUSSON et. al., 2013; TOUSSON, 2013).

2.3.2 Undecilenato de Boldenona

A BOL é classificada como um hormônio EAA de cadeia extensa (1,4-androstadiene-17 β -ol-3-one), comercialmente disponível em veículo oleoso a base de óleo de gergelim, o que confere a esta molécula uma meia vida longa e a impossibilidade de ser administrado com outros fármacos simultaneamente. Difere da testosterona apenas por uma ligação dupla em seu primeiro anel (PLUMB, 2005; STOLKER et al., 2007) (Figura 2).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classifica a BOL como medicamento de 2ª classe (promotor de crescimento), com potencial carcinogênico, mais elevado que outros andrógenos como o ES, ND e T, sendo, portanto, uma substância de uso banido (IARC, 1987).

Figura 2- Fórmula química da Testosterona e Boldenona.



Fonte: KALININI, 2011.

Em um estudo realizado com três grupos de coelhos, sendo o primeiro grupo controle, o segundo grupo recebendo 4,4 mg/kg de undecilenato de boldenona (BOL) e o terceiro grupo tendo recebido 8,8 mg/kg deste composto, foram avaliados, dentre outros parâmetros, as características espermáticas, níveis séricos de testosterona e avaliação histopatológica dos órgãos sexuais masculinos. Concluiu-se que, a longo prazo, houve características marcantes de diminuição no volume de ejaculado nos dois grupos tratados. Adicionalmente, houve uma acentuada queda na motilidade e na contagem espermática no grupo tratado com a maior dose de BOL quando comparado ao grupo controle (ODA; EL-ASHMAWY, 2012).

No que se refere a alterações histopatológicas, o estudo supracitado apresenta resultados semelhantes ao conduzido por TOUSSON e colaboradores (2012) que revelaram haver alterações histopatológicas testiculares nos grupos que utilizaram a BOL. Tais grupos foram divididos de acordo com diferentes quantidades de aplicação e avaliados três semanas após a última administração. Pôde-se observar espessamento na membrana basal dos túbulos seminíferos juntamente com alterações degenerativas vacuolares nas células de Sertoli no

grupo que recebeu uma injeção de BOL. Em contrapartida, os demais grupos que receberam duas e três injeções do EAA, as alterações morfológicas notadas foram mais marcantes e tendendo à irreversibilidade do tecido afetado, como degeneração do epitélio germinativo.

Paralelamente às alterações em órgãos sexuais, sabe-se que o uso dos EAA pode levar a alterações comportamentais em humanos, desta forma, Mohammed e colaboradores (2016) investigaram este e outros parâmetros em 60 coelhos machos. Os parâmetros de ingestão de comida, locomoção e auto-higienização foram significativamente mais elevados nos grupos tratados com o hormônio do que no grupo controle.

Ainda foi possível estudar o impacto negativo na quantidade de hormônios sexuais séricos quando da administração da BOL. Os autores observaram que os coelhos tratados com este composto tiveram uma redução significativa nos níveis séricos de testosterona e uma marcada elevação nos níveis séricos de estradiol em relação do grupo controle. O mesmo ocorreu ao se comparar o grupo que recebeu três aplicações do esteroide, o que gerou um aumento significativo de estradiol quando comparado com o grupo que recebeu apenas duas aplicações. Porém, não houve diferenças estatísticas em relação aos níveis séricos de testosterona entre os dois grupos tratados (com duas e com três aplicações) (MOHAMMED et al, 2016).

2.3.3 Estanazolol

Este derivado sintético da testosterona tem sido utilizado, assim como os demais, com o objetivo de aumentar a massa muscular e força, além de aumentar a resistência à fadiga muscular. Porém seus efeitos adversos são conhecidos e estudados há mais de 20 anos como cessação da espermatogênese. O tratamento com ES pode aumentar as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GR em ratos Wistar sedentários, conforme evidenciado por Delgado e colaboradores (2010), mostrando que de maneira semelhante, são características observadas quando os animais são submetidos a exercícios físicos sem o uso de qualquer agente anabolizante. No entanto, ES não foi efetivo na melhora da capacidade de resistência física.

Similarmente, observou-se em outro estudo, os efeitos antioxidantes do ES, ao se verificar que o mesmo protegeu a musculatura de ratos contra o dano oxidativo de proteínas e alterações na membrana de ácidos graxos quando induzidos a exercícios intensos. Neste caso, o efeito protetor deste componente não foi devido ao aumento nas atividades enzimáticas

antioxidantes mitocondriais, mas sim à diminuição da geração de ROS mitocondrial, apesar de não ter havido melhora da resistência à fadiga (SABORIDO et al., 2011).

O uso de estanozolol tem sido estudado também quanto à fragilidade osmótica eritrocitária em situações de atividade física, e o que se observou em estudo conduzido por BAYON e colaboradores (1993) foi que tanto este derivado hormonal quanto a L-carnitina são capazes de aumentar a resistência osmótica dos eritrócitos em ratos após administrações diárias por 12 semanas. Este aumento é, segundo estes autores, graças ao efeito eritropoietico, assim como a uma interação do ES e de seus metabólitos com a membrana eritrocitária, quando este é administrado durante o exercício físico.

Dessa maneira, diante de todas as vantagens apresentadas, este agente anabolizante tem sido estudado a fim de se obter as suas propriedades benéficas em detrimento dos seus efeitos deletérios já conhecidos, e que se apresentam de maneira significativa quando utilizados por longos períodos.

2.4 Estresse Oxidativo e Mecanismos Antioxidantes

Em situações fisiológicas, a formação de ERO ocorre normalmente no organismo, especialmente em razão do metabolismo mitocondrial. Em torno de 1 a 2% do O₂ escapa da redução para sua neutralização, resultando na formação de ânion superóxido (O^{2•-}), peróxil (RO₂[•]), hidroperóxil (HRO₂[•]), e o radical hidroxila (OH[•]); e as espécies não radiculares como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ácido hidrocloreto (HOCL) (MOLINA, 2003; HALLIWELL et al., 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008). Em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares, conhecidos como sistemas antioxidantes eles terminam por serem neutralizados.

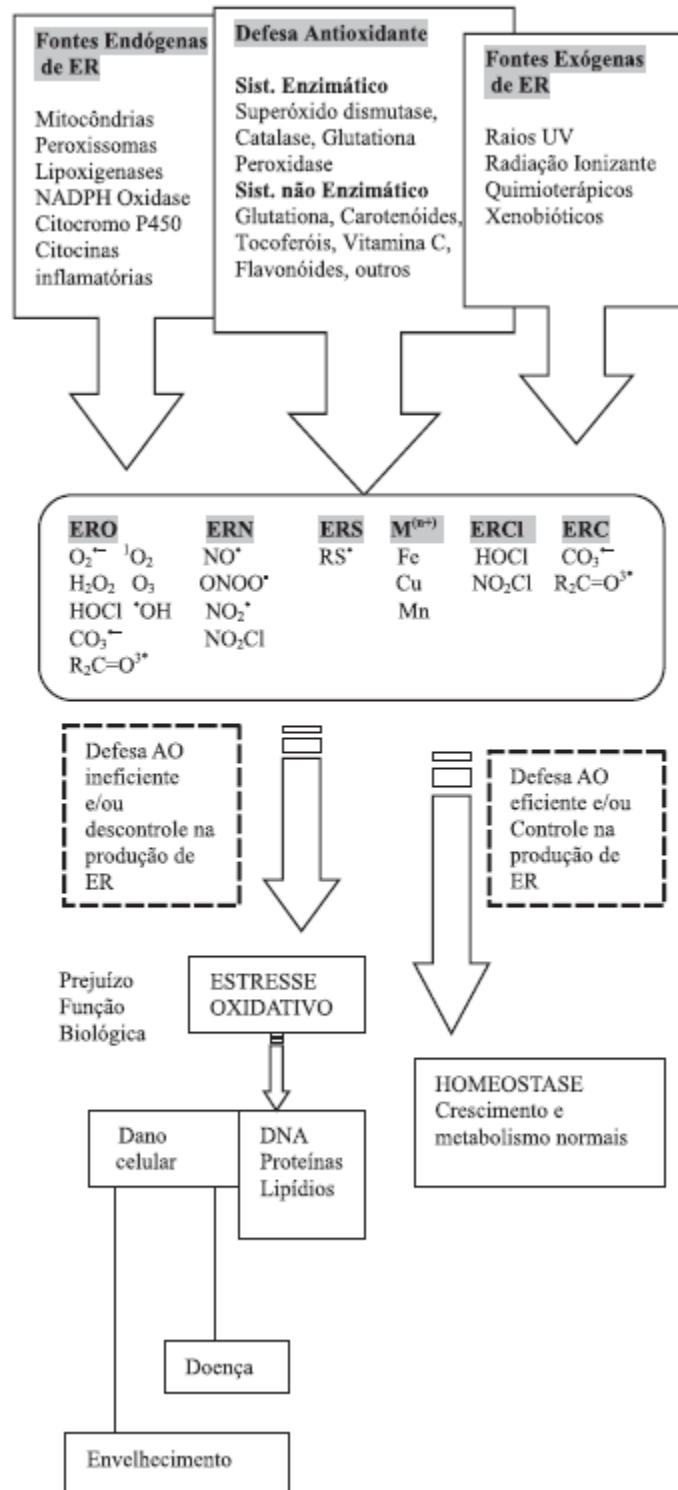
As células possuem um sistema de proteção antioxidante enzimático e não enzimático, que tem a importante função de inibir os efeitos deletérios das ERO através do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes (CHIHUAILAF et al., 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Esse sistema antioxidante enzimático é composto pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO. Através destas enzimas as células mantêm as concentrações do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio baixas, evitando assim, a formação do radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A SOD é uma metaloenzima que participa do processo de detoxificação dos radicais livres, ela é

específica na remoção do radical superóxido, catalisando a sua dismutação a peróxido de hidrogênio, através da reação que transforma dois ânions de radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em um peróxido de hidrogênio menos reativo que o anterior. O peróxido de hidrogênio formado é degradado pela ação da CAT ou da GPx, resultando em H_2O e O_2 . (ANDERSON, 1996).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos pode-se destacar a vitamina C, a vitamina E e os compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (SH) denominados tióis. A vitamina C apresenta propriedades antioxidantes protegendo várias moléculas contra o dano causado pelas ERO (HALIWELL et al., 2000). Além de sua ação direta contra radicais livres, o ácido ascórbico ou vitamina C afeta indiretamente o balanço entre antioxidantes e oxidantes, já que promove a regeneração do alfa tocoferol um importante agente lipossolúvel (LIU et al., 1998). Os tocoferóis ou vitamina E são varredores de radicais peroxil sendo, portanto, os inibidores mais importantes da peroxidação lipídica em animais. Em adição, a glutatona reduzida (GSH) é um tiol de baixo peso molecular que se encontra no interior celular, sendo importante na proteção contra o dano oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em situações patológicas, a produção de ERO pode aumentar substancialmente, exaurindo esse sistema antioxidante, resultando em dano a diversas moléculas, o que se denomina estresse oxidativo (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; BURTON; JAUNIAUX, 2011). As macromoléculas, como o DNA, as proteínas e os lipídeos, são sensíveis à presença de ERO. A peroxidação lipídica inicia quando estas alteram as ligações dos ácidos graxos da membrana celular alterando sua coesão e permeabilidade alterando as funções metabólicas celulares (CHIHUAILAF et al., 2002). Este processo resulta na formação de hidrocarbonetos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), que são mensurados para a determinação do dano a essa estrutura através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BEHULIAK et al., 2009). Membranas testiculares são altamente vulneráveis ao estresse oxidativo devido ao seu elevado teor de ácido graxo poli-insaturado; por conseguinte, maiores níveis de MDA poderiam ser esperados em danos provocados pelas ERO neste tecido (Figura 3).

Figura 3- Vias de formação e remoção de ERO, peroxidação lipídica e ação antioxidante.



Fonte: Vasconcelos, 2007.

Pouco se sabe sobre o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento dessas lesões testiculares. Estudos apresentados por diversos autores mostraram que a administração de testosterona sintética pode influenciar potencialmente a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no testículo (PELTOLA et al., 1996; CHAINY et al., 1997; TURNER; LYSIAK, 2008; TÓTHOVA et al., 2013; FRANKENFELD et al., 2014; MOHAMED; MOHAMED, 2014). Outro estudo revelou que a administração de testosterona conduziu a um aumento significativo no estresse oxidativo em testículos de coelhos (AYDILEK et al., 2004). Somado a esses resultados, o tratamento intra testicular ou sistêmico com EAA diminui a expressão das enzimas SOD, CAT e Gpx nos testículos (CHAINY, SAMANTARAY; SAMANTA, 1997; AYDILEK, AKSAKAL; KARAKILCIK, 2004; AITKEN; SHAUN, 2008, MOHAMED; MOHAMED, 2014).

2.4.1 Estresse Oxidativo, Anabolizantes e o Testículo

A espermatogênese é um processo extremamente ativo de replicação capaz de gerar cerca de 1.000 espermatozoides por segundo com um consumo altamente elevado de O₂ pelo epitélio germinativo. Esses espermatozoides possuem uma membrana altamente rica em ácidos graxos poli-insaturados, o que os torna suscetíveis às ERO. Apesar da intensa atividade mitótica e do alto metabolismo local, o testículo possui uma circulação pobre, o que provoca baixa tensão de O₂ local, podendo este ser um mecanismo de defesa do órgão contra o dano oxidativo (PELTOLA et al., 1994; KODAMA et al., 1996; SIKKA, 2004).

Além dessa defesa, tendo sido reportado que o testículo possui um sistema antioxidante muito eficiente, rico em GSH, SOD e GPx com envolvimento importante no desenvolvimento da proliferação e diferenciação espermáticas e, assim, promovendo proteção dessas células germinativas ao ataque das ERO (TEAF et al., 1985). O testículo possui, além das formas convencionais da SOD (citosólica e mitocondrial), uma SOD extracelular (SOD-ex) produzida pelas células de Sertoli e germinativas (MRUK et al., 2002). Esse sistema é de suma importância, pois têm sido relatadas evidências do envolvimento do aumento do estresse oxidativo provocado por xenobióticos, hormônios, cigarro, etanol e criptorquidismo na disfunção espermática, revelando a íntima relação dos aumentos das ERO com a patologia espermática (ROSENBLUM et al., 1985; KOJIMA et al., 1990; AHOTUPA; HUHTANIEMI, 1992; PELTOLA et al., 1994; CHAINY et al., 1997). Em pacientes com patologias espermáticas, a capacidade antioxidante total é significativamente mais baixa

quando comparada à de indivíduos normais (KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007).

O envolvimento do processo oxidativo está estritamente relacionado com a infertilidade (CHAINY et al., 1997; KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007; LANZAFAME et al., 2009). Inúmeros relatos têm demonstrado que a subfertilidade devido à queda da qualidade espermática está diretamente relacionada ao aumento dos parâmetros de oxidação do sêmen e ainda a uma queda na capacidade antioxidante do mesmo (JONES et al., 1979; SALEH; AGARWAL, 2002; LANZAFAME et al., 2009).

Especificamente no testículo, diversos estudos relatam as alterações histopatológicas provocadas pelo uso de anabolizantes, assim como as alterações nos níveis de testosterona, quem controlam a espermatogênese (TAKAHASHI et al., 2004; GABR et al., 2009; TOUSSON et al., 2012).

Os EAA provocam uma série de efeitos colaterais em diferentes órgãos. As alterações hepáticas e renais já estão descritas e apontam para um estreito envolvimento do estresse oxidativo e a fisiopatologia das lesões histológicas nesses tecidos. O aumento sérico de ureia, creatinina, AST e ALT em alguns trabalhos indicam que os esteroides anabolizantes tenham um efeito tóxico nesses dois órgãos e que este efeito esteja relacionado com a diminuição da capacidade de remoção das ERO desses tecidos (TOUSSON et al., 2011a; TOUSSON et al., 2011b; EL-MOGHAZY et al., 2012; TOUSSON et al., 2013).

Acredita-se que as alterações provocadas pelos EAA no sêmen sejam reflexo de dano oxidativo provocado no tecido testicular induzido pelo uso e abuso desses EAA. E ainda, devido à diminuição da capacidade antioxidante total em outros tecidos que sofrem o efeito tóxico do uso da BOL principalmente, supõe-se que os testículos também sofram dessa diminuição. Por essa razão, o uso de antioxidantes ou substâncias protetoras, tais como as hormonais, poderia diminuir ou anular os efeitos deletérios decorrentes do aumento da produção de ERO induzido pelos EAA no testículo e, dessa forma, reduzir o impacto das ERO na qualidade do sêmen.

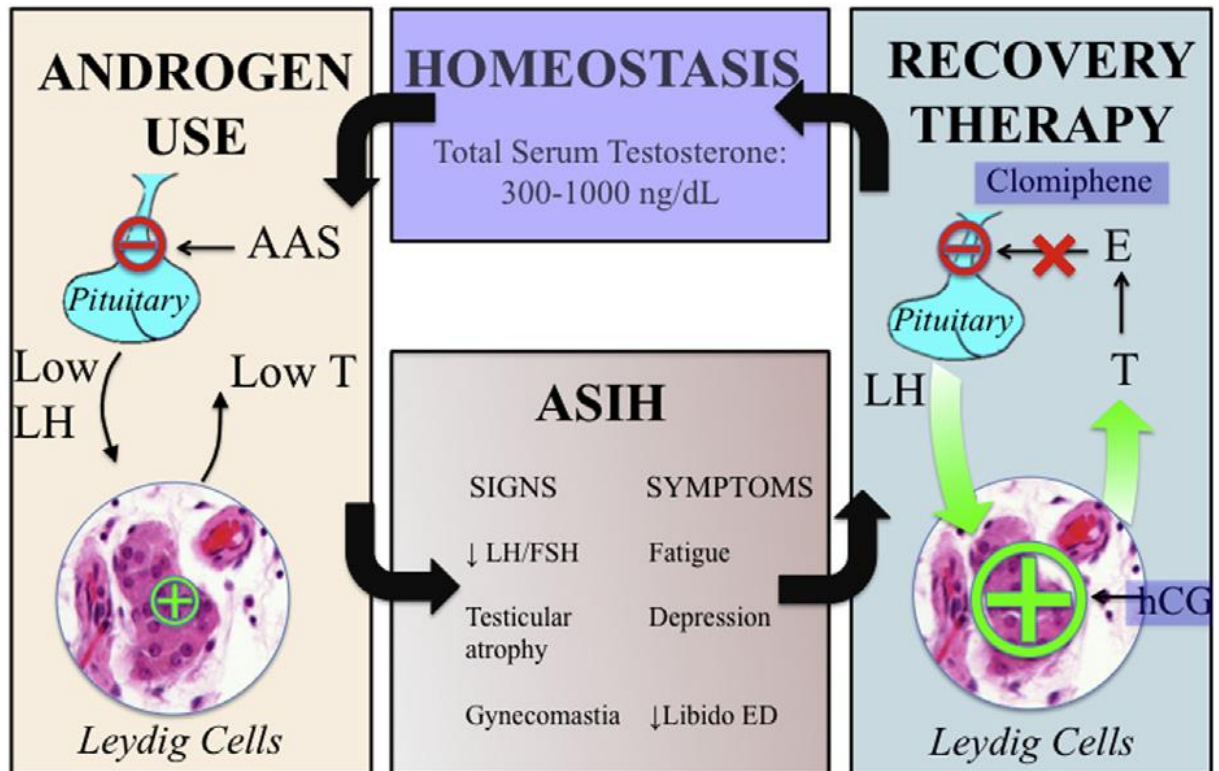
2.5 Hipogonadismo Hipogonadotrópico Induzido por Anabolizantes

A maior parte da pesquisa a respeito dos problemas reprodutivos causados pelo uso de EAA foi impulsionada devido aos casos de infertilidade em homens. Uma condição particular conhecida como hipogonadismo induzido por anabólicos esteroides (HIAE) tornou-se uma preocupação real desde que começaram a surgir casos de efeitos colaterais causados pelo abuso dessas substâncias. Claramente descrita em 1990 por Jarow e Lipshultz, o HIAE

recentemente foi identificado como uma causa potencialmente sub-reconhecida de hipogonadismo em homens jovens (JAROW; LIPSHULTZ, 1990; COWARD et al., 2013).

O uso de EAA resulta em hipogonadismo hipogonadotrópico pela supressão do *feedback* no eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (EHPG) via inibição da liberação pulsátil de GnRH e subsequente diminuição de LH e FSH (Figura 4). A duração da supressão e o resultante HIAE sintomático é altamente variável e dependente de múltiplos fatores, incluindo diferenças na escolha das drogas, quantidade administrada e duração do uso. Pode haver diferenças individuais em relação à resposta cinética do EHPG (RAHNEMA et al., 2014). Alguns pesquisadores sugerem que indivíduos mais jovens possam ter um eixo “mais elástico” capaz de recuperar a pulsação de GnRH e secreção de gonadotropinas mais rápido e mais completamente do que usuários de EAA mais velhos (MORETTI et al., 2007; RAHNEMA et al., 2014).

Figura 4 – Ilustração da patofisiologia do hipogonadismo induzido por esteroides androgênicos anabólicos (HIAE) e mecanismo de ação de estratégias de tratamento selecionadas. A terapia de recuperação concentra-se no bloqueio do estrogênio ao nível do hipotálamo para encorajar a pulsação de GnRH e liberação de gonadotropinas para reiniciar o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (EHPG) e aumentar a produção de testosterona.



Fonte: Rahnema. Anabolic steroid-induced hypogonadism. *Fertility and Sterility*, 2014.

Variações consideráveis existem em relação às combinações de drogas, dose e duração do uso. Em humanos, até 90% dos usuários combinam ou acumulam múltiplos andrógenos, uma prática que os usuários acreditam que forneça os melhores resultados enquanto se minimizam os efeitos colaterais indesejados (EVANS, 1997; EVANS, 2004). Tradicionalmente, um ciclo típico de *bodybuilding* inclui um acúmulo de vários EAA numa dose combinada de 500-1.500 mg/semana e dura em média 4-12 semanas (PERRY et al., 1992; EVANS, 1997; PERRY et al., 2005; GRAHAM et al., 2008).

Embora alguma evidência exista descrevendo o período de recuperação após o uso de testosterona exógena como um hormônio de reposição (KIM et al., 2013), é provável que uma interrupção endócrina mais complexa e global exista devido ao acúmulo e ciclos de múltiplas doses altas de androgênicos e outras drogas auxiliares, culminando em um único fundo farmacológico (EVANS, 2004). Além das consequências sistêmicas do hipogonadismo hipogonadotrópico, estudos em animais sugerem que toxicidade testicular direta resulta do uso de andrógenos sintéticos (CHAINY et al., 1997; KARILA et al., 2004; MORETTI et al., 2007; SHOKRI et al., 2010; DE SOUZA e HALLAK, 2011; BOETTCHER et al., 2011). Contudo, a significância desses achados não é bem estabelecida e a extensão do quanto o uso abusivo de EAA pode contribuir para a falha gonadal primária ainda não está clara e requer estudos mais aprofundados (RAHNEMA et al., 2014).

2.5.1 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) no tratamento do Hipogonadismo Hipogonadotrópico Induzido por Anabolizantes

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um membro da família de hormônios glicoproteicos (HGP), os quais também abrangem LH, FSH e TSH. Todos os HGP são heterodímeros consistindo de uma subunidade- α e uma subunidade- β . A subunidade- α , que contém 92 aminoácidos, é comum a todos os HGP. A subunidade- β confere atividade biológica e exibe vários graus de homologia, sendo entre a hCG e o LH de aproximadamente 80% (STENMAN et al., 2006).

Esse hormônio medeia sua ação por meio do receptor de LH/hCG e sua principal função é manter a produção de progesterona do corpo lúteo durante o início da gravidez. Vários outros tecidos também expressam o receptor de LH/hCG e sua presença na vasculatura do útero pode indicar que o hCG exerce uma função fisiológica importante nesse tecido (STENMAN et al., 2006).

A depuração do hCG da circulação tem sido estudada tanto após a injeção de hCG purificada como após a gravidez. A meia-vida do hCG injetável é bifásica; a fase rápida possui meia-vida de 5-6 horas, enquanto que a fase lenta possui meia-vida de 24-33 horas (RIZKALLAH, GURPIDE; VANDE WIELE, 1969; WEHMANN; NISULA, 1981). A maior parte do hCG na circulação é metabolizada pelo fígado, enquanto que aproximadamente 20% é excretada pelos rins (NISULA et al., 1989).

A hCG tem sido associada há muito tempo com o início e manutenção da gravidez, mas até hoje, seus potenciais efeitos nos processos associados à infertilidade têm sido subestimados (FILICORI et al., 2005). Ela é produzida em grandes quantidades pelas células trofoblásticas da placenta, assim como por tumores de várias origens, mas parece que esse hormônio não exerce nenhum efeito fisiológico em homens (HUSSA, 1981; O'CONNOR et al., 1994).

O primeiro ensaio para hCG descrito em 1927 foi baseado na atividade biológica do hCG parcialmente purificado a partir de urina (ASCHEIM; ZONDEK, 1927). Desde então, várias modificações e melhorias foram usadas para diagnosticar gravidez até que os imunoenaios gradualmente substituíram os bioensaios (WIDE; GEMZELL, 1960; VAITUKAITIS, BRAUNSTEIN; ROSS, 1972).

Medicações endócrinas que são direcionadas especificamente para melhorar a função hipotalâmica-pituitária-gonadal têm sido bem descritas e incluem ésteres de testosterona, de hCG, análogos sintéticos do GnRH e antiestrógenos (MEDRAS; TWOROWSKA, 2001). Tem sido relatado que a hCG usada sozinha foi bem-sucedida no tratamento de pessoas com azoospermia (MARTIKAINEN et al., 1986; GILL, 1998). Nesses casos, a função testicular, uma vez que volta ao normal, continua adequada mesmo após a interrupção da terapia com este hormônio (MENON, 2003).

Relatos em pacientes humanos com queixa de falha na fertilidade são encontrados na literatura e o uso de hCG em doses que variam de 1.000 a 10.000 UI de hCG em dias alternados demonstrou eficácia no retorno da função reprodutiva desses pacientes (TUREK et al., 1995; MENON, 2003; HSIE et al., 2013). Contudo, pesquisadores demonstraram que terapias com baixas doses de hCG manteve os níveis intratesticulares de testosterona durante administração de EAA, sugerindo que esse tratamento pode também preservar os parâmetros seminais em homens em terapia com anabolizantes (TUREK et al., 1995; COVIELLO et al., 2005).

A pesquisa da terapia com hCG tem se limitado a relatos de casos ou estudos longitudinais em humanos, entretanto, é importante ressaltar que espécies animais - principalmente a equina - também é potencialmente exposta a problemas reprodutivos em decorrência do uso de EAA. Tendo em vista que esse uso não será facilmente banido, principalmente naqueles animais utilizados para finalidades esportivas e que as falhas reprodutivas posteriores ou mesmo durante a terapia com EAA são muitas vezes atribuídas a causas indeterminadas, o estudo com hCG na Medicina Veterinária faz-se necessário para avaliar a minimização dos problemas reprodutivos.

A BOL e o ES são uma das drogas mais frequentemente utilizadas na medicina veterinária e estão entre os quatro anabolizantes mais usados em humanos. Diante desse quadro, o objetivo desta tese é elucidar de que forma esses anabolizantes interferem na lesão hepática e testicular, através da avaliação de marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios. Determinar se a associação com a gonadotrofina coriônica humana é positiva, nula ou deletéria para a função testicular, e ainda, se há nesse contexto, influência da dose e tipo de protocolo para que a lesão testicular não ocorra ou seja revertida, uma vez que não há trabalhos descrevendo os efeitos do hCG em ratos tratados com BOL, bem como poucos trabalhos observaram os parâmetros metabólicos, de estresse oxidativo e inflamatórios para fígados de ratos tratados com esses anabolizantes. Com os resultados, o grupo espera poder contribuir para uma redução do uso abusivo de EAA.

3 ARTIGO 1 - IMPACTS OF DOSE AND TIME OF BOLDENONE AND STANAZOLOL EXPOSURE IN THE ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEMS, MYELOPEROXIDASE AND NAGASE ACTIVITIES AND GLYCOGEN AND LACTATE LEVELS IN RAT LIVER.

Este manuscrito foi submetido para publicação no periódico Redox Report ISSN 1932-6203, Qualis A1 na Medicina Veterinária com fator de impacto 3,23.

Impacts of dose and time of boldenone and stanazolol exposure in the enzymatic antioxidant systems, myeloperoxidase and NAGase activities and glycogen and lactate levels in rat liver

Cibele L Lhamas¹, Fabiano B Carvalho^{2#}, Indiara Brusco², Sara M Oliveira², Nathieli B Bottari², Aniélen D Silva², Vanessa Miron², Mariana S Alves², Jossiele W Leitemperger², Vânia L Loro², Maria Rosa C Schetinger², Vera M Morsch², Cinthia M de Andrade^{1,2#}

¹ Department of Small Animal Clinic, Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

² Department of Chemistry (Biochemistry), Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil

Corresponding authors.

Cinthia Melazzo de Andrade: Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Veterinary Hospital, Laboratory of Biochemistry and Oxidative Stress, Center of Rural Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: + 55-55 3220 9557.

E-mail address: cmelazzoandrade1@gmail.com

Fabiano Barbosa Carvalho: Postgraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center for Natural and Exact Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: + 55-55 3220 9557.

E-mail address: carvalhofb.bio@gmail.com

Cibele Lima Lhamas ORCID ID: [0000-0002-0245-7907](https://orcid.org/0000-0002-0245-7907)

Abstract

Objectives: The present study investigated the adverse effects of boldenone (BOL) and stanazolol (ST) on the enzymatic antioxidant systems in rat liver.

Methods: Ninety adult male Wistar rats were randomly assigned to PI: 5 mg/kg BOL or ST, once a week for 4 weeks; PII 2.5 mg/kg BOL or ST, once a week for 8 weeks; and PIII 1.25 mg/kg BOL or ST, once a week for 12 weeks. Each treatment included a control group that received an olive oil injection (vehicle control) and anabolic androgenic steroids (AAS) were administered intramuscularly (a total volume of 0.2 ml) once a week in all protocols. The glutathione antioxidant system (glutathione peroxidase (GPx), glutathione s-transferase (GST) and glutathione reductase (GR)) and the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were investigated. It was also verified the content of hydrogen peroxide (H₂O₂) and activity of enzymes markers of neutrophil (myeloperoxidase, MPO) and macrophage (NAGase). The glycogen and lactate contents were evaluated as markers of hepatic metabolic function.

Results: PI and PII alter the SOD and CAT activities, and increase the H₂O₂ content. PI also showed increase in the MPO and NAGase activity. In contrast, changes in the GPx, GST and GR were observed in the PII and, with greater prominence, PIII. In the PIII, GPx, GR and GST had a reduction in their activity. In relation to the metabolic markers, all protocols altered the glycogen and lactate content. The use of short-periods/high-dose of AAS first alters SOD/CAT activity. In contrast, the use of AAS at long periods/reduced dose is more associated with changes in the glutathione

system. Regardless of the protocol investigated, changes in glycogen and lactate content were present.

Conclusion: Our results suggest that the protocol with 5 mg/kg BOL or ST, once a week for 4 weeks showed the most deleterious effects to the redox status, markers of cellular infiltration as well as to the metabolic functioning of the hepatic tissue.

Keywords: AAS; Enzymatic Antioxidant Systems; Myeloperoxidase; NAGase; Oxidative Stress; Liver.

1 Introduction

The deleterious effects that arise from the prolonged use of high doses of anabolic androgen steroids (AAS) have been widely documented and include liver and cardiac failure, hepatic adenomas, mood fluctuations, and aggressive behavior [1–5]. Although these molecules can offer therapeutic benefits due to their structural and functional similarity to testosterone, aesthetic and competitive motivations often lead users to exceed the recommended dose by up to 100 times, in order to improve muscle size and strength and enhance athletic performance [6, 7]. Moreover, these users consume a cocktail of steroids in cycles of 4–12 weeks to maximize steroid receptor binding and increase the desired effect [8, 9].

Previous studies have shown that AAS lead to increased levels of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress markers in several organs, such as the kidney [10] and testis [11]. There is a close relationship between increases in oxidative and inflammatory damage and negative impacts on hepatic metabolic functions [12]. The liver is actively involved in several metabolic and detoxifying processes; as a result, this organ is continually exposed to high levels of endogenous and exogenous oxidants and pro-oxidant agents like AAS [12, 13].

Some clinical and subclinical conditions may impair the normal capacity of the liver to synthesize glycogen via several pathways, one of which is the oxidative pathway. As AAS abuse is a cause of hepatic oxidative stress, the metabolic products of the liver are not adequately produced under this condition [14, 15]. Another organic compound that is related to the detox system is lactate. Current evidence suggests that this compound is an important intermediary in various metabolic processes and that it may mediate oxidative metabolism in various compartments, both within and between cells [16].

Since the liver is one of the target organs subject to the attack of pro-oxidants during AAS use and as hepatic glycogen and lactate have important roles in its metabolism, the measurement of these compounds can help to detect the occurrence of dysfunction. Similarly, the concomitant investigation of the antioxidant capacity of the liver may indicate oxidative imbalances and inflammatory states even before the occurrence of metabolic alterations in this organ.

Boldenone undecylenate (BOL; androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one) has intense anabolic and moderate androgenic properties [17–19], while stanazolol (ST; 3-methylpiperidin-1-yl-[1-(3-phenylpropyl)piperidin-4-yl]methanone) is considered safe even at high doses, remaining unaffected by its first pass through the hepatic metabolism [20, 21]. Thus, we speculated that treatment with BOL would be more deleterious to the liver. In addition, we hypothesized that higher doses would be more harmful, signaling that considerable a great imbalances in the oxidant/antioxidant system could be irreversible in terms of generation of lesions in liver tissues.

In this context, the aim of this study was to evaluate and compare the individual effects of BOL and ST when administered to rats in different doses and for lengths of time, in order to determine whether they contribute to alterations in enzymatic antioxidant systems, inflammatory cell markers, and the glycogen and lactate content in the liver.

2 Materials and methods

2.1 Animals

We acquired 90 Wistar rats (60 days old, approximately 250–300 g each) from the Central Animal Facility of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The

animals were kept in the Central Animal House of the same institution in colony cages at an ambient temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a relative humidity of 45–55%, with dark/light cycles of 12 h. They had free access to a standard rodent pellet diet and water *ad libitum*. All procedures were carried out according to the recommendations for animal care from the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL). This work was approved by the ethical committee of UFSM (protocol number 032/2014).

2.2 Experimental protocol: administration of BOL and ST

Treatment with ST (EstrombolTM, Fundación Lab, Argentina) and BOL (EquipoiseTM, Fort Dodge Laboratories, USA) was carried out with three different protocols (I, II and III) according to recent studies from our group [10, 11, 22]. In all protocols, the administration of vehicle (olive oil) or the intramuscular injection of AAS (total volume, 0.2 ml) was performed once per week. In protocol I (n = 30), 5 mg/kg ST or BOL was administered for 4 weeks. In protocol II (n = 30), 2.5 mg/kg ST or BOL was administered for 8 weeks, and in protocol III (n = 30), 1.25 mg/kg ST or BOL was administered for 12 weeks. In protocol I, the objective was to reproduce the consequences of using higher doses of AAS than those recommended over a short time interval. Protocol II aimed to represent the use of a moderate dose of AAS for an intermediate period. Finally, protocol III represented users who are concerned about the androgenic effects of AAS and thus reduce the dose while prolonging the exposure time [22].

2.3 Glycogen and lactate levels

For the determination of metabolic parameters in the liver, we produced two homogenates. The basic homogenate was used for glycogen analyses, and the acid homogenate was used for lactate analyses. Glycogen levels in the liver (50 mg of tissue) were determined after the addition of potassium hydroxide (KOH; 6N) and ethanol (96%) for hydrolysis and precipitation of glycogen, as previously described [23] with minor modifications [24]. For lactate determination, 50 mg of liver tissue was homogenized by adding trichloroacetic acid (TCA; 10%) using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1000 × *g* for 10 min to precipitate proteins. The completely deproteinized supernatant was used for lactate determination [25] by measuring the absorbance at a of 570 nm.

2.4 Enzymatic antioxidant systems

2.4.1 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured in the supernatant with a method based on the autoxidation reaction of adrenaline to adrenochrome. The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD. Results are expressed as U SOD/mg of protein. One SOD unit was defined as the enzyme amount necessary to cause 50% inhibition of adrenaline autoxidation [26].

2.4.2 Catalase (CAT) activity

CAT activity was assessed as previously described [27] with minor modifications [28]. Activity was determined by measuring the decomposition of 30 mM H₂O₂ in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at 240 nm for 120 s in a temperature-controlled (37°C) Hitachi U-2001 spectrophotometer. Results are

expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ of protein, and appropriate controls for the non-enzymatic decomposition of H_2O_2 were included in the assay.

2.4.3 *Glutathione reductase (GR)*

GR activity was determined as described by Carlberg et al. [29]. This method is based on the ability of the enzyme to convert oxidized glutathione (GSSG) to glutathione (GSH) in the presence of the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Briefly, liver supernatant (15 μl) was added to medium containing 0.2 M phosphate buffer (0.2 M K_2HPO_4 and 2 mM EDTA, pH 7.0) and NADPH (2 mM). The reaction was initiated by adding the substrate GSSG (20 mM). GR levels were measured by determining the absorbance at 340 nm during an incubation of 2 min. GR activity was determined using the molar extinction coefficient $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and expressed as nmol/h/mg of protein.

2.4.4 *Glutathione peroxidase (GPx) activity*

GPx activity was determined using the liver supernatant, GR and NADPH. This method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm [30]. Enzymatic activity is expressed as nmol/h/mg of protein.

2.4.5 *Glutathione S-transferase (GST) activity*

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm using the method of Habig et al. [31]. The mixture contained the liver supernatant being tested, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which was used as a substrate. Enzymatic activity is expressed as nmol/h/mg of protein.

2.4.6 Hydrogen peroxide (H_2O_2) levels

H_2O_2 levels were determined as previously described [32] with minor modifications. First, 100 mg of fresh liver was homogenized in 500 μ l of 10 mM phosphate buffer (TFK) pH 7.0 on ice. Subsequently, 250 μ l of 0.2% TCA was added to the homogenate. The samples were homogenized and centrifuged at 12,000 rpm and 4°C for 10 min. The supernatants were aliquoted (100 μ l) and mixed with potassium iodide solution (1M) prepared in TFK buffer. In the blanks, only TFK buffer was added in place of the potassium iodide solution. Samples were incubated at approximately 25°C for 1 min. and absorbances were read at 400 nm. The results are expressed in μ M of H_2O_2 /mg tissue.

2.5 Leukocyte infiltration markers

To estimate the infiltration of inflammatory cells into the liver, samples were collected, and the activities of myeloperoxidase (MPO) and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), markers of neutrophil and macrophage infiltration, respectively, were determined [33–35]. First, liver samples were homogenized in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) and EDTA (0.1 mM) containing 0.5% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide and centrifuged at 16,000 $\times g$ at 4°C for 20 min; the supernatant was then collected. For the measurement of MPO activity, 10 μ l of supernatant was added to 200 μ l of acetate buffer (200 mM, pH 5.4) and 20 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (18.4 mM) in a 96-well plate and incubated at 37°C for 3 min. To stop the reaction, microplates were incubated in an ice bath, and 30 μ l of acetic acid was added. The color formed was assessed at 630 nm.

For the measurement of NAGase activity, 25 μ l of the supernatant was incubated with 25 μ l of 4-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (2.24 nM) and 100 μ l of citrate buffer (50 mM, pH 4.5) at 37°C for 1 h. After incubation, 100 μ l of glycine buffer (0.2 mM, pH 10.4) was added to stop the reaction and to allow for the development of color, which was measured at 405 nm. The absorbances of all reactions were measured in a Fisher Biotech Microkinetics Reader BT 2000 microplate reader. The values are expressed as optical densities corrected for protein content.

2.6 Protein determination

Protein concentration was measured using the Coomassie Blue method [36], with bovine serum albumin as a standard.

2.7 Statistical analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. of the number of experiments indicated. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test. $P < 0.05$ was considered a significant difference for all experiments. Statistical analyses were performed using the software package GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

3 Results

3.1 Effect of different doses and exposure periods of BOL and ST on enzymes in the glutathione antioxidant system

We assessed GPx (Fig. 1A–C), GR (Fig. 1D–F), and GST (Fig. 1G–I) activities after treatment with BOL or ST under protocols I, II, and III. Neither treatment with BOL nor ST altered GPx activity under protocol I [$F(2,20) = 0.239$, $P > 0.05$]. Under protocol II, an increase in GPx activity was induced by both AAS [$F(2,20) = 5.036$, $P < 0.05$]. In contrast, under protocol III, reductions in GPx activity were induced by BOL and ST [$F(2,20) = 20.70$, $P < 0.001$]. In terms of GR activity, no significant changes were observed following BOL or ST treatment under protocol I [$F(2,20) = 0.030$, $P > 0.05$]. However, both BOL and ST reduced the activity of GR under protocols II [$F(2,20) = 5.848$, $P < 0.05$] and III [$F(2,20) = 9.554$, $P < 0.01$]. Lastly, neither BOL nor ST altered GST activity under protocols I [$F(2,20) = 0.216$, $P > 0.05$] or II [$F(2,20) = 2.832$, $P > 0.05$]. In contrast, both AAS reduced GST activity under protocol III [$F(2,20) = 9.222$, $P < 0.01$].

3.2 BOL and ST reduce SOD activity and increase CAT activity under protocols I and II

Figure 2 shows the SOD (Fig. 2A–C) and CAT (Fig. 2D–F) activities after treatment with BOL or ST under protocols I, II, and III. BOL and ST reduced SOD activity under protocols I [$F(2,20) = 15.81$; $P < 0.001$] and II [$F(2,20) = 8.222$; $P < 0.01$]. In contrast, no significant changes were observed under protocol III [$F(2,20) = 0.449$; $P > 0.05$]. An increase in CAT activity was seen under protocols I [$F(2,20) = 17.25$; $P < 0.001$] and II [$F(2,20) = 18.63$; $P < 0.001$] following treatment with by both AAS. No changes were observed in CAT activity under protocol III [$F(2,20) = 0.319$; $P > 0.05$].

3.3 BOL and ST increase the H₂O₂ content under protocols I and II

We next assessed the H₂O₂ content after treatment with BOL or ST under protocols I (Fig. 3A), II (Fig. 3B), and III (Fig. 3C). Both BOL and ST increased the H₂O₂ content in the livers of rats under protocols I [F(2,29) = 10.49; P < 0.001] and II [F(2,29) = 6.984.49; P < 0.01]. No significant differences were observed under protocol III [F(2,29) = 0.054; P > 0.05].

3.4 Protocol I increases the activities of MPO and NAGase in the livers of rats

Figure 4 shows the MPO (Fig. 4A–C) and NAGase (Fig. 4D–F) activities after treatment with BOL or ST under protocols I, II, and III. BOL and ST increased MPO [F(2,20) = 3.613, P < 0.05] and NAGase [F(2,20) = 3.842, P < 0.05] activities only under protocol I. No significant effects were observed for MPO [protocol II: F(2,20) = 0.189, P > 0.05; protocol III: F(2,20) = 1.283, P > 0.05] or NAGase [protocol II: F(2,20) = 2.859, P < 0.05; protocol III: F(2,20) = 0.562, P < 0.05] under protocols II or III.

3.5 BOL and ST alter hepatic glycogen and lactate levels

Finally, we assessed glycogen (Fig. 5A–C) and lactate (Fig. 5D–F) levels after treatment with BOL or ST under protocol I, II, and III. BOL and ST reduced the glycogen content only under protocol I [F(2,29) = 5.009; P < 0.05]. Under protocol II, an increase in glycogen content was observed for both AAS [F(2,29) = 8.348; P < 0.01], while no significant change in glycogen content was observed under protocol III [F(2,29) = 0.134; P > 0.05]. In contrast, both BOL and ST reduced the lactate content under protocols I [F(2,29) = 5.481; P < 0.05], II [F(2,29) = 5.264; P < 0.05], and III [F(2,29) = 5.572; P < 0.05].

4 Discussion

In the present study, we observed the effects of the overuse of BOL or ST by administering these molecules under with three different protocols. Various treatment regimens with BOL and ST elicited changes in the oxidative status, glycogen and lactate levels, and MPO and NAGase activities of the rat liver. However, we observed changes in the enzymes of the glutathione system only under protocols II and III. We observed an increase in GPx activity accompanied by a reduction in GR activity under protocol II. It is well known that GR is required to maintain glutathione in its reduced form (GSH) and that the recovery of GSH by GR is an essential step in maintaining the integrity of the cellular protection system [37]; low concentrations of this enzyme are indicative of consumption due to imbalances in the redox state of the organ. In contrast, protocol III led to reductions in the activities of all three enzymes. It is likely that the glutathione system became more active during the longer protocol, in contrast with protocol I, in which another antioxidant defense system was more active.

The enzymatic antioxidant system contains two key enzymes involved in the detoxification of the radicals superoxide and H_2O_2 . SOD and CAT are endogenous enzymes that represent the first line of antioxidant defense. SOD catalyzes the dismutation of the superoxide radical anion to H_2O_2 and O_2 , while CAT promotes the decomposition of H_2O_2 to O_2 and H_2O [38]. It is important to note that these data provide an assessment of a specific moment in the oxidative stress process, which is known to be a dynamic process. Although these data are punctual, the interpretation must be always seen as a global and changeable process. We observed reductions in the activity of SOD under both protocols I and II. In contrast, CAT showed the

opposite effect, with increases in activity under protocols I and II. No changes were observed in either enzyme under protocol III.

The reductions in SOD activity observed under protocols I and II stem from an imbalance in the oxidative state and, possibly, to increases in the levels of the superoxide radicals in the liver in response to AAS. This oxidative state imbalance is corroborated by another study from our research group showing increases in the levels of ROS and consequently in lipid peroxidation under protocol I [10]. This increase exceeded the ability of SOD to neutralize these oxidants and, consequently, activated CAT. This indicates AAS abuse exhausts the antioxidant capacity of the liver. In comparison, under protocol III, in which the duration of exposure to AAS was prolonged, the production of ROS was controlled by SOD activity, leading to no activation of CAT. Instead, this protocol recruited the glutathione system, indicating that the accumulation of ROS was not substantial to induce increased SOD activity. It can thus be assumed that an adaptation to the continuous exposure to AAS has taken place under protocol III, as it is known that the liver exhibits a considerable regenerative capacity [13].

Another substance that deserves attention due to the impairment in the balance of the redox state is H_2O_2 , which is considered highly toxic *in vivo* and should be rapidly eliminated by enzymes such as catalases and peroxidases [38, 39]. However, Halliwell et al. have shown that this oxidant can be used as an inter- and intracellular signaling molecule [39]. Evidence of its signaling role has accumulated rapidly and indicates that H_2O_2 should not be completely eliminated because in sites of inflammation, H_2O_2 generated by activated phagocytes appears to modulate the inflammatory process [40, 41]. Increases in the content of H_2O_2 were verified only under protocols I and II. In addition, under the same protocols (I and II), CAT activity

increased with no concurrent changes observed in the glutathione system. The CAT pathway actively degrades excess H_2O_2 in the liver. This effect is accompanied by a reduction in the activity of SOD in the cited protocols. Furthermore, under protocol III, H_2O_2 levels were the same as those in the control with no further changes in the CAT/SOD pathways; thus, it is possible that the glutathione pathway is involved under this protocol.

As mentioned above, inflammatory cells are producers of oxidizing substances, such as hydrogen peroxide. Neutrophils and macrophages are components of the leukocytes present in the circulation that are in transit between the production sites for those of function or destruction, and their main functions are related host defense [42]. Under inflammatory conditions, they infiltrate tissues at different stages of this process [43]. The presence of neutrophils is known to lead to an increase in MPO activity [44], and there is a high correspondence between the number of macrophages and the activity of NAGase [45]. Thus, these substances can be useful indicators of the infiltration of these cellular types.

In this study, we observed increases in MPO and NAGase activities only under protocol I. This indicates that there was greater infiltration of neutrophils and macrophages under a higher dose of AAS administered for a shorter amount time. Phagocytic cells in their activated state exhibit high H_2O_2 levels, and the infiltration of these cells may favor an increase in H_2O_2 levels, inducing increased oxidative stress and consequently altering the activities of the CAT and SOD enzymes in the liver.

The liver plays a central role in energy metabolism, and glycogen and lactate are important products in this functioning, acting as indicators of adequate organ function. A change in the redox state induced reductions in the lactate content under all three protocols tested. In contrast, a reduction in glycogen content was observed

only under protocol I, while an increase was observed under protocol II and no significant change in glycogen was found under protocol III. The lack of a change in this compound under protocol III indicates that in terms of the proper functioning of the hepatic metabolism, a lower accumulation of ROS is likely to induce less damage to the physiological state of the organ.

5 Conclusion

In summary, we observed that under protocol I, the first line of antioxidant defense, involving the SOD and CAT pathways, was more active, leading to the consumption of SOD and an increase in CAT. This is consistent with the higher concentration of H₂O₂ under the same protocol. In contrast, the glutathione system was active under protocol III; thus, this protocol was less deleterious to the liver due to the reduced accumulation of H₂O₂. Protocol II was in the middle in terms of liver damage, and it was useful to follow up the progression in the antioxidant system. Our results were confirmed by the assessment of MPO and NAGase activities, which increased under protocols inducing accumulations of H₂O₂. Similarly, reductions in the metabolic products glycogen and lactate reflected the poor functioning of the liver under the more deleterious protocol.

Based on these results, we conclude that protocol I is the most deleterious in terms of the parameters studied, as it led to a breakdown in the first line of antioxidant defense, greater infiltration of inflammatory cells, and consequently greater accumulations of hydrogen peroxide in liver tissues. This imbalance in the redox state was also evident in terms of the hepatic metabolism, with reductions in glycogen and lactate products indicating a metabolic malfunction of the liver in AAS protocols involving higher doses within shorter periods.

Conflicts of Interest Statement

There are no conflicts of interest in this study.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Clark AS, Costine BA, Jones BL, Kelton-Rehkopf MC, Meerts SH, Nutbrown-Greene LL, Penatti CA, Porter DM, Yang P, Henderson LP. Sex- and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions. *Brain Research*. 2006;1126:122-38.
2. Clark AS, Henderson LP. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003;27:413-36.
3. Smith ST, Stackman RW, Clark AS. Spatial working memory is preserved in rats treated with anabolic-androgenic steroids. *Brain Research*. 1996;737:313-6.
4. Clark AS, Lindenfeld RC, Gibbons CH. Anabolic-androgenic steroids and brain reward. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 1996;53:741-5.
5. Clark AS, Barber DM. Anabolic-androgenic steroids and aggression in castrated male rats. *Physiology & Behavior*. 1994;56:1107-13.
6. Ding NS, De Cruz P, Lim L, Thompson A, Desmond P. Androgenic-anabolic steroid drug-induced liver injury. *Internal Medicine Journal*. 2013;43:215-6.
7. Cohen J, Collins R, Darkes J, Gwartney D. A league of their own: demographics, motivations and patterns of use of 1,955 male adult non-medical anabolic steroid users in the United States. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2007;4:12.
8. Salas-Ramirez KY, Montalto PR, Sisk CL. Anabolic steroids have long-lasting effects on male social behaviors. *Behavioural Brain Research*. 2010;208:328-35.
9. Salas-Ramirez KY, Montalto PR, Sisk CL. Anabolic androgenic steroids differentially affect social behaviors in adolescent and adult male Syrian hamsters. *Hormones and Behavior*. 2008;53:378-85.
10. Dornelles GL, Bueno A, de Oliveira JS, da Silva AS, Franca RT, da Silva CB, Machado MS, Petry LD, Abdalla FH, Lhamas CL, de Andrade CM. Biochemical and oxidative stress markers in the liver and kidneys of rats submitted to different protocols of anabolic steroids. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;425:181-9.
11. Bueno A, Carvalho FB, Gutierrez JM, Lhamas CL, Brusco I, Oliveira SM, Amaral MG, Dorneles G, Sorraia J, Duarte MM, Andrade CM. Impacts of dose and time of boldenone and stanozolol exposure in inflammatory markers, oxidative and nitrosative stress and histopathological changes in the rat testes. *Theriogenology*. 2017;90:101-8.
12. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Medical Hypotheses*. 2016;93:150-3.
13. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16:26087-124.

14. Neri M, Bello S, Bonsignore A, Cantatore S, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V. Anabolic androgenic steroids abuse and liver toxicity. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011;11:430-7.
15. van Amsterdam J, Opperhuizen A, Hartgens F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*. 2010;57:117-23.
16. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of Physiology*. 2004;558:5-30.
17. Soma LR, Uboh CE, Guan F, MC-Donnell S, Pack J. Pharmacokinetics of boldenone and stanozolol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in racehorses and nonrace horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2007; 30:101-108.
18. Verheyden K, Noppe H, Mortier V, Vercruyssen J, Claerebout E, Van Immerseel F, Janssen CR, de Brabander HF. Formation of boldenone and boldenone-analogues by maggots of *Lucilia sericata*. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 586:163-170.
19. Gryglik D, Olak M, Miller JS. Photoderadation kinetics of androgenic steroids boldenone and trenbolone in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2010; 212:14-19.
20. Deshmukh N, Hussain I, Barker J, Petroczi A, Naughton D. Analysis of anabolicsteroids in human hair using LC-MS/MS. *Steroids*. 2010; 75:710-714.
21. Maini AA, Maxwell-Scott H, Marks DJ. Severe alkalosis and hypokalemia with stanozolol misuse. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2014; 32:196e3-196e4.
22. Bueno A, Carvalho FB, Gutierrez JM, Lhamas C, Andrade CM. A comparative study of the effect of the dose and exposure duration of anabolic androgenic steroids on behavior, cholinergic regulation, and oxidative stress in rats. *PLoS One*. 2017;12:e0177623.
23. Bidinotto PM, Moraes G, Souza RHS. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol Tec CEPTA Pirassununga* 1997;10.
24. Menezes C, Fonseca MB, Leitemperger J, Pretto A, Moraes BS, Murussi CR, Baldisserotto B, Loro VL. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2015;41:323-30.
25. Harrower JR, Brown CH. Blood lactic acid--a micromethod adapted to field collection of microliter samples. *Journal of Applied Physiology*. 1972;32:709-11.
26. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972;247:3170-5. Epub 1972/05/25.
27. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-6.
28. Furian AF, Oliveira MS, Royes LF, Fiorenza NG, Figuera MR, Myskiw JC, Weiblen R, Rubin MA, Frussa-Filho R, Mello CF. GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007;43:924-32.
29. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 1985;113:484-90.
30. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1967;70:158-69.

31. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974;249:7130-9.
32. Caetano AC, da Veiga LF, Capaldi FR, de Alencar SM, Azevedo RA, Bezerra RM. The antioxidant response of the liver of male Swiss mice raised on a AIN 93 or commercial diet. *BMC Physiology*. 2013;13:3.
33. Lloret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochemical Pharmacology*. 1995;50:347-53. Epub 1995/07/31.
34. Suzuki M, Asano Y. [Urinary enzyme determination and its clinical significance. C. Enzyme derived from the kidney tubular epithelium--N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. 9. Clinical study of urinary NAG activity in patients with various kidney diseases]. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*. 1983;Spec No 56:139-46. Epub 1983/09/01.
35. Silva MA, Trevisan G, Klafke JZ, Rossato MF, Walker CI, Oliveira SM, Silva CR, Boligon AA, Flores FC, de Bona Silva C, Athayde ML, Ferreira J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146:393-401. Epub 2013/01/22.
36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-54.
37. Locigno R, Castronovo V. Reduced glutathione system: role in cancer development, prevention and treatment (review). *International Journal of Oncology*. 2001;19:221-36.
38. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body *FEBS Letters Volume 486, Issue 1. FEBS Letters*. 2000;486:10-3.
39. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen Peroxide. Ubiquitous in Cell Culture and In vivo? *IUBMB Life Volume 50, Issue 4-5. IUBMB Life*. 2000;50:251-7.
40. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18:642-60.
41. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:39860-9.
42. Jackaman C, Tomay F, Duong L, Abdol Razak NB, Pixley FJ, Metharom P, Nelson DJ. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Research Reviews*. 2017;36:105-16.
43. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011;13:e23.
44. Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *Journal of Pharmacological Methods*. 1990;23:179-86.
45. Chagunda MG, Larsen T, Bjerring M, Ingvarsen KL. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *The Journal of Dairy Research*. 2006;73:431-40.

Figure Captions:

Figure 1. Enzymatic system of glutathiones. Glutathione peroxidase (GPx, A, B and C), glutathione reductase (GR, D, E and F) and Glutathione S-Transferase (GST, G, H and I) of rats treated with vehicle (olive oil, 0.2 mL), boldenone (BOL) or stanazolol (ST) once a week (intramuscular) following Protocol I (n=10, 4 weeks, 5 mg/kg), Protocol II (n=10, 8 weeks, 2.5 mg/kg) or Protocol III (n=10, 12 weeks, 1.25 mg/kg). # indicates significant difference between BOL and ST. One-way ANOVA followed by Tukey test. All data are expressed as mean \pm SEM (*, # p<0.05, **, ## p<0.01, ***, ### p<0.001).

Figure 2. Superoxide dismutase (SOD, A, B and C) and catalase (CAT, D, E and F) activities in liver of rats treated with vehicle (olive oil, 0.2 mL), boldenone (BOL) or stanazolol (ST) once a week (intramuscular) following Protocol I (n=10, 4 weeks, 5 mg/kg, graph A), Protocol II (n=10, 8 weeks, 2.5 mg/kg, graph B), or Protocol III (n=10, 12 weeks, 1.25 mg/kg, graph C). # indicates significant difference between BOL and ST. One-way ANOVA followed by Tukey test. All data are expressed as mean \pm SEM (*, # p<0.05, **, ## p<0.01, ***, ### p<0.001).

Figure 3. Hydrogen peroxide (H₂O₂, A, B and C) in liver of rats treated with vehicle (olive oil, 0.2 mL), boldenone (BOL) or stanazolol (ST) once a week (intramuscular) following Protocol I (n=10, 4 weeks, 5 mg/kg, graph A), Protocol II (n=10, 8 weeks, 2.5 mg/kg, graph B) or Protocol III (n=10, 12 weeks, 1.25 mg/kg, graph C). # indicates significant difference between BOL and ST. One-way ANOVA followed by Tukey test. All data are expressed as mean \pm SEM (*, # p<0.05, **, ## p<0.01, ***, ### p<0.001).

Figure 4. Myeloperoxidase (MPO, A, B and C) and NAGase (D, e and F) activities in liver of rats treated with vehicle (olive oil, 0.2 mL), boldenone (BOL), or stanazolol (ST) once a week (intramuscular) following Protocol I (n=10, 4 weeks, 5 mg/kg, graph A), Protocol II (n=10, 8 weeks, 2.5 mg/kg, graph B) or Protocol III (n=10, 12 weeks, 1.25 mg/kg, graph C). # indicates significant difference between BOL and ST. One-

way ANOVA followed by Tukey test. All data are expressed as mean \pm SEM (*,# $p < 0.05$, **,## $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$).

Figure 5. Glycogen (A, B and C) and lactate (D, E and F) levels in the liver of rats treated with vehicle (olive oil, 0.2 mL), boldenone (BOL) or stanazolol (ST) once a week (intramuscular) following Protocol I (n=10, 4 weeks, 5 mg/kg, graph A), Protocol II (n=10, 8 weeks, 2.5 mg/kg, graph B), or Protocol III (n=10, 12 weeks, 1.25 mg/kg, graph C). # indicates significant difference between BOL and ST. One-way ANOVA followed by Tukey test. All data are expressed as mean \pm SEM (*,# $p < 0.05$, **,## $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$).

Figure 1

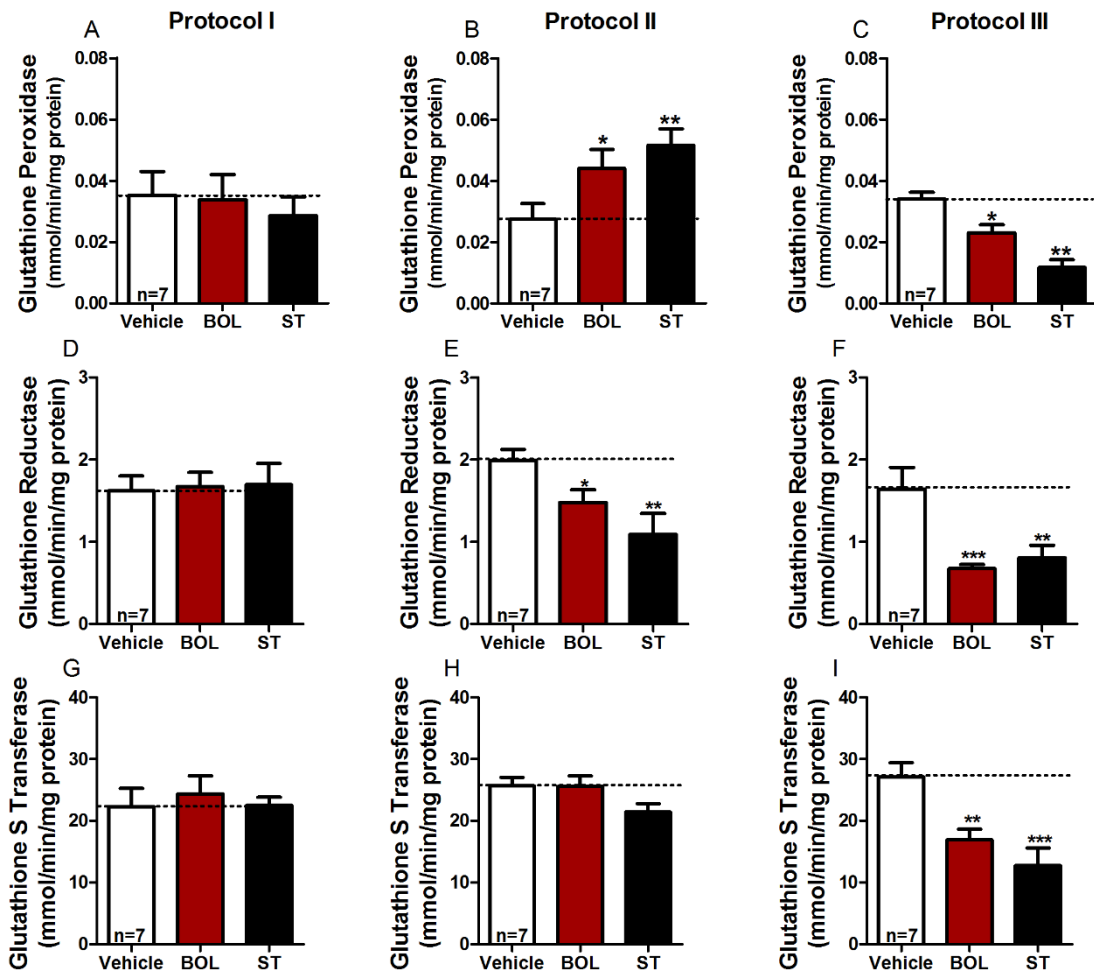


Figure 2

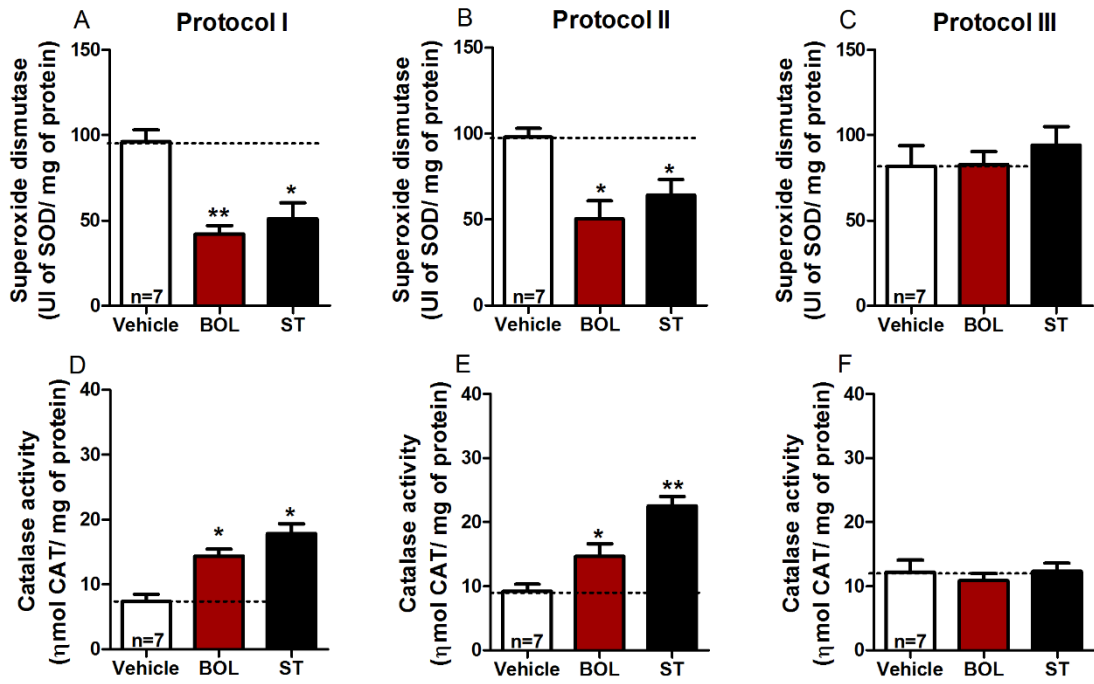


Figure 3

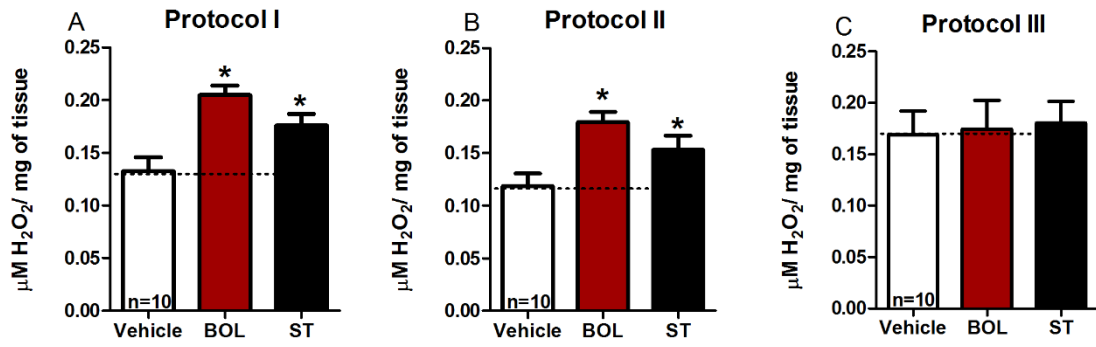


Figure 4

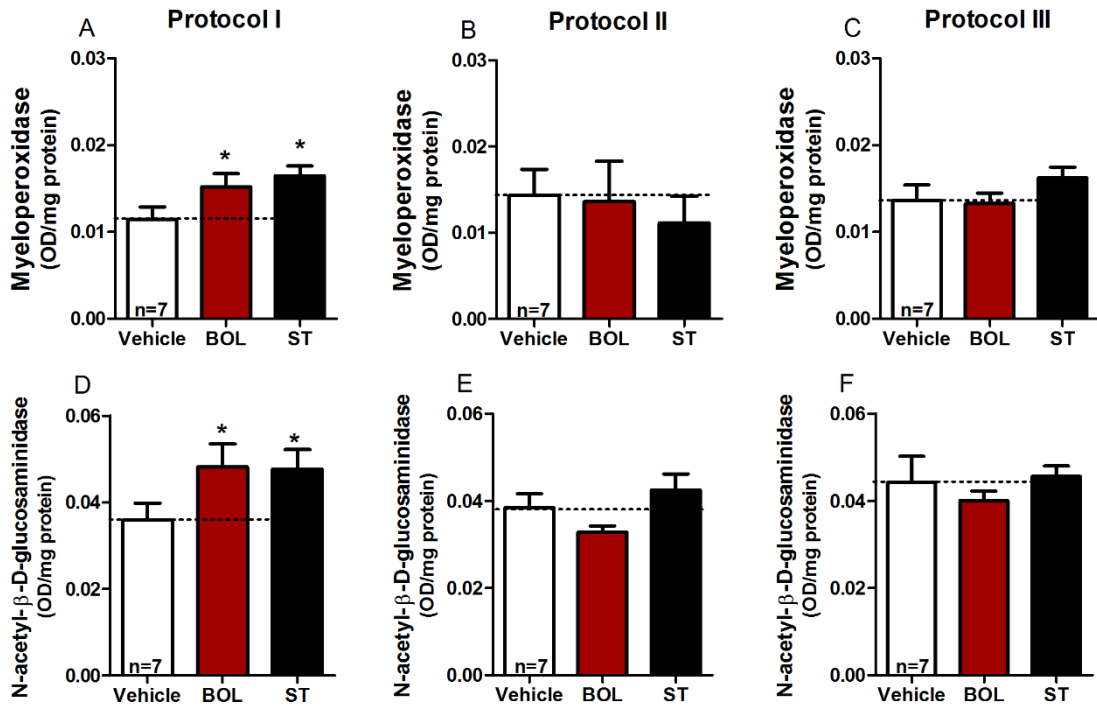
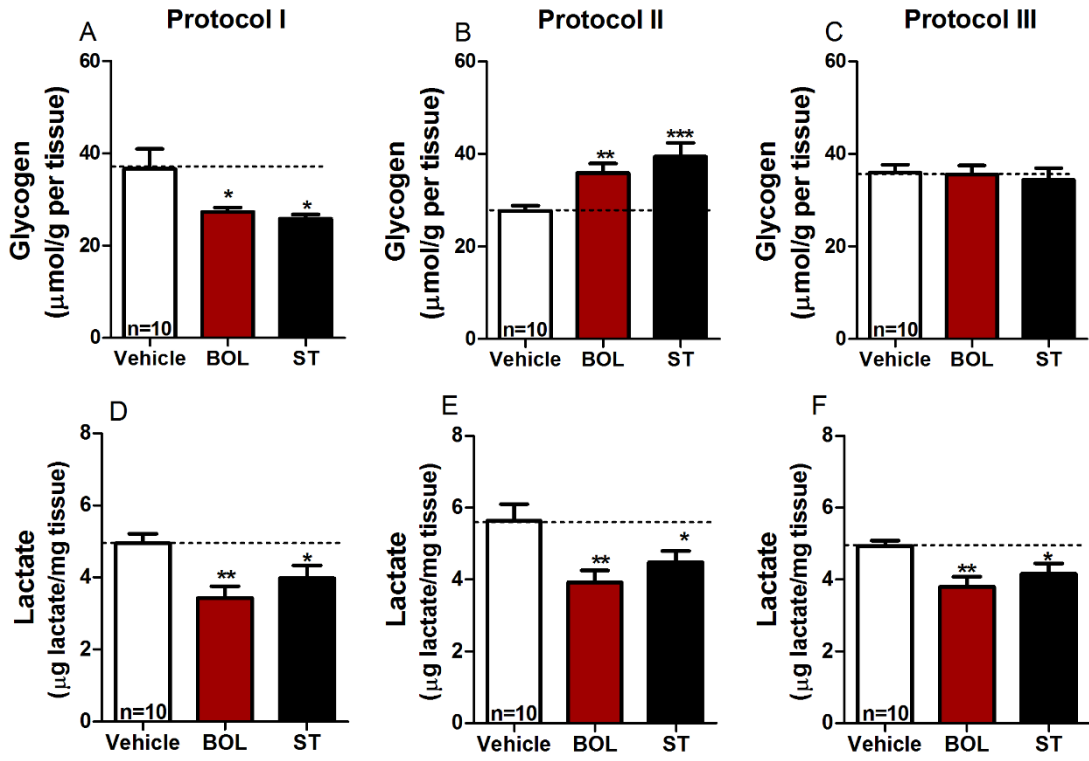


Figure 5



ARTIGO 2 - A GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA PREVINE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA TESTICULAR INDUZIDA PELO UNDECILENATO DE BOLDENONA

O manuscrito a seguir será submetido para publicação na língua inglesa, conforme normas do periódico BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH AND ANIMAL SCIENCE – ISSN 1413-9596, Qualis B3 na Medicina Veterinária com fator de impacto 0,16.

A Gonadotrofina Coriônica Humana previne a Peroxidação Lipídica Testicular Induzida pelo Undecilenato de Boldenona

Cibele Lima LHAMAS¹; Fabiano Barbosa CARVALHO²;
Nathieli Biachin BOTTARI³; Kalyne BERTOLIN⁴; Alessandra BRIDI⁴; Roberto Marinho MACIEL⁵; Cinthia Melazzo de ANDRADE⁶.

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Hospital Veterinário, Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, Santa Maria – RS, Brazil

² Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Patologia, Porto Alegre – RS, Brazil

³ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica), Departamento de Bioquímica, Santa Maria – RS, Brazil

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica Médica de Grandes Animais, Santa Maria – RS, Brazil

⁵ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Patologia, Santa Maria – RS, Brazil

⁶ Universidade Federal de Santa Maria, Hospital Veterinário, Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, Santa Maria – RS, Brazil

Resumo

A presente avaliação preliminar examinou parâmetros de estresse oxidativo como níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de mieloperoxidase (MPO) nos testículos de ratos tratados com undecilenato de boldenona (BOL) associado ou não à gonadotrofina coriônica humana (hCG). Para tal, foram utilizados 68 ratos machos, Wistar pesando entre 200 e 300 g, mantidos em condições padrões de umidade e temperatura e divididos em 8 grupos: [I]: 0,2 mL de veículo por 8 semanas; [II] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG placebo durante as últimas 3 semanas; [III] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG50 durante as últimas 3 semanas; [IV] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG200 durante as últimas 3 semanas; [V] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG50 após as 8 semanas de tratamento; [VI] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG200 após as 8 semanas de tratamento; [VII] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas com 3 aplicações de hCG placebo após as 8 semanas de tratamento; [VIII] 8 mg/kg de BOL por 8 semanas e animais mantidos sem aplicação de nenhuma substância até o tempo de espermatogênese completa ser alcançado (aproximadamente 60 dias). Os dados demonstraram efeitos benéficos do hCG tanto na dose de 50U como na dose de 200U ao se considerar os marcadores MPO e TBARS nos protocolos de prevenção, contudo o mesmo efeito benéfico não foi observado nos protocolos de reversão. Esses dados sugerem que o uso do hCG é benéfico para prevenir lesão testicular quando a administração da BOL for realizada juntamente com o hCG, não sendo mais eficaz após a instalação da lesão.

Palavras-chave: Peroxidação Lipídica; Testículos; Mieloperoxidase; Undecilenato de Boldenona; Estresse Oxidativo.

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) são relatadas como danificadoras de quase todas as macromoléculas celulares, incluindo ácidos graxos poli-insaturados de membrana, causando, conseqüentemente, comprometimento das funções celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; SIES, 1991). As membranas testiculares são altamente ricas em ácidos graxos poli-insaturados, sendo, portanto, um órgão altamente suscetível aos efeitos do estresse oxidativo (CHAINY et al., 1997). Os esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) têm sido amplamente utilizados na terapia de condições médicas normalmente relacionadas a deficiências androgênicas devido a distúrbios hipotalâmicos, hipofisários ou mesmo testiculares (MUTALIP et al., 2013). Além disso, os EAA são comumente aplicados como terapia androgênica em pacientes sem deficiências androgênicas, mas com doenças crônicas com o intuito de melhorar a qualidade de vida por meio da obtenção dos efeitos ótimos da testosterona (HANDELSMAN, 2006).

Hormônios esteroides sintéticos foram desenvolvidos principalmente para uso veterinário, principalmente no tratamento de cavalos (TOUSSON et al., 2012). Recentemente, Undecilenato de Boldenona (BOL) vem sendo utilizada por fisiculturistas durante tanto a baixa temporada como durante o pré-teste, período no qual é bem conhecido o aumento da vascularização muscular enquanto se prepara para um concurso de fisiculturismo. A BOL é conhecida sob os nomes comerciais Equipoise, Ganabol, Equigan e Ultragan. Na maioria dos países do mundo, este esteroide anabolizante é proibido em animais que serão utilizados para consumo e também para o uso humano (KUHN, 2002; SOMA et al., 2007; CANIZZO et al., 2007). A BOL possui uma meia-vida muito longa e pode aparecer em um teste para detecção de esteroides por até 1,5 anos (TOUSSON et al., 2012).

Embora sejam usados em tratamentos clínicos, também foi identificado que os EAA causem alguns efeitos adversos para pacientes e consumidores atletas. Isso é apoiado por estudos revelando que os efeitos anabólicos promissores se juntam a inúmeros efeitos colaterais físicos e fisiológicos (EVANS, 2004; HARTGENS; KUIPERS, 2004). Os efeitos adversos relatados incluem atrofia testicular com redução da fertilidade (DOHLE et al., 2003), hipertensão (FERENCHICK, 1990), aterosclerose (COHEN et al., 1988), coagulação sanguínea (PARSSINEN; SEPPALA, 2002), neoplasmas hepáticos e carcinomas (VELAZQUEZ; ALTER, 2004), lesão tendínea (BATTISTA et al., 2003) e transtornos psiquiátricos e comportamentais (CLARK; HENDERSON, 2003).

Além disso, EAA exógenos como a BOL podem induzir efeitos deletérios no sistema reprodutivo masculino que levam à infertilidade. Tais efeitos podem ser descritos como

apoptose de células germinativas testiculares, redução severa de espermatogônias de célula positiva antígeno-nuclear em proliferação, redução nos níveis séricos de testosterona, volume seminal, motilidade e contagem dos espermatozoides além de um aumento significativo nos níveis de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (TOUSSON et al., 2011; TOUSSON et al., 2012; TOUSSON et al., 2016; TOUSSON, 2016). A estreita relação entre o aumento dos níveis de ERO's e o impacto negativo na morfologia espermática foi previamente descrita e, em particular, o *status* antioxidante do sêmen foi significativamente menor em comparação com o sêmen normal (CHAINY et al., 1997; AGARWAL; SALEH, 2002; AGARWAL et al., 2003). Especificamente no testículo, vários estudos relatam alterações histopatológicas causadas por esteroides anabolizantes, bem como alterações nos níveis de testosterona – que controlam a espermatogênese (TAKAHASHI et al., 2004; TOTHOVA et al., 2013). Em síntese, a exposição aos EAA induz a alterações espermáticas devido ao elevado dano oxidativo desencadeado por quantidades excessivas de moléculas reativas no tecido testicular.

Todavia, um hormônio produzido em mulheres e que aumenta drasticamente durante a gestação, a gonadotrofina coriônica humana (hCG), passou a ser utilizada por homens na forma de ciclos enquanto os EAA são administrados. Tratamentos hormonais com LH e hCG são proibidos pela WADA (Agência Mundial Antidoping) em relação aos seus papéis fisiológicos ligados ao metabolismo da testosterona no corpo (STRAHM et al., 2011). Há evidências inequívocas de que o hCG nos homens faz com que a testosterona seja produzida e liberada. Assim, os esportistas poderiam usar o hCG para aumentar a produção endógena de testosterona, mas também para compensar o uso prolongado de EAA que podem estar prejudicando a regulação da produção de esteroides no corpo (HANDELSMAN, 2006; BASARIA, 2010).

Tendo em vista a necessidade de uma concentração ótima de testosterona intratesticular como pré-requisito para que o início e a manutenção da espermatogênese ocorram, algumas pesquisas focaram nessa concentração para determinar a fertilidade de homens com hipogonadismo hipogonadotrófico induzido por anabolizantes (COVIELLO et al., 2005). Muitos desses estudos utilizaram doses baixas de hCG com o intuito de evitar que doses maiores, como as comumente utilizadas por atletas, possam expor os pacientes a altos níveis de T e estradiol com o conseqüente risco de desenvolvimento de ginecomastia clinicamente significativa (ZITZMANN; NIESCHLAG, 2000). A utilização de doses relativamente baixas de hCG manteve as concentrações de testosterona intratesticular dentro

de valores normais em homens saudáveis com supressão gonadotrópica (COVIELO et al., 2005).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar os efeitos da BOL associada ou não ao hCG e, desta forma, determinar qual protocolo contribui mais para o dano oxidativo e/ou possui maior capacidade protetora ao testículo.

Os tecidos foram obtidos de 68 ratos machos, Wistar, pesando entre 200 – 300 g, provindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos em gaiolas a temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a uma umidade relativa de 45 – 55%, com ciclos claro/escuro de 12 horas. Os animais tinham acesso livre a uma ração padrão para roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações de cuidado animal do NIH Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (número de protocolo: 6135161015).

O tratamento com BOL (BOL, Equipoise™, Fort Dodge Lab, USA) foi realizado em oito protocolos diferentes divididos em dois protocolos principais: “prevenção” e “reversão”. Os grupos foram divididos conforme a seguir: [I] Controle; [II] Ciclo BOL + Placebo hCG; [III] Ciclo BOL + hCG50; [IV] Ciclo BOL + hCG200; [V] Reversão BOL + hCG50; [VI] Reversão BOL + hCG200; [VII] Reversão BOL + Placebo hCG; [VIII] Reversão Espermatogênese. Em todos os protocolos, a administração do veículo (óleo de oliva) ou a injeção intramuscular do EAA (volume total de 0,2 mL) foram realizados uma vez por semana. No Grupo I, (n = 6) 0,2 mL de veículo foram administrados por 8 semanas; no Grupo II, (n = 8) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de placebo de hCG com solução salina de NaCl a 0,9% nas últimas 3 semanas; no Grupo III, (n = 10) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de hCG na dose de 50UI nas últimas 3 semanas; no Grupo IV, (n = 10) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de hCG na dose de 200UI nas últimas 3 semanas; no Grupo V, (n = 10) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de hCG na dose de 50UI após as 8 semanas de tratamento com EAA; no Grupo VI, (n = 10) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de hCG na dose de 200UI após as 8 semanas de tratamento com EAA; no Grupo VII, (n = 6) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8 semanas com 3 aplicações de placebo de hCG após 8 semanas de tratamento com EAA; no Grupo VIII, (n = 8) 8 mg/kg de BOL foram administrados por 8

semanas e os animais foram mantidos sem aplicações de nenhuma substância até que o tempo para a espermatogênese completa fosse alcançado (60 dias).

Para estimar a infiltração de células inflamatórias nos testículos, amostras foram coletadas e as atividades de mieloperoxidase (MPO), o qual é um marcador de infiltração de neutrófilos, foram determinadas. Primeiramente, as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e EDTA (0,1 mM) contendo 0,5% de Brometo de Hexadeciltrimetil-amônio e centrifugadas a 16.000 g a 4 °C por 20 minutos; o sobrenadante foi então coletado. Para a mensuração da atividade da MPO, 10 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de tampão acetato (200 mM, pH 5,4) e 20 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (18,4 mM) em uma placa de 96 poços e incubada a 37 °C por 3 minutos, em duplicatas. Para parar a reação, as microplacas foram incubadas em banho de gelo e 30 µL de ácido acético foram adicionados. A coloração formada foi avaliada a 630 nm.

Os níveis de malondialdeído (MDA) foram obtidos a partir de homogeneizado dos testículos como previamente descrito (OHKAWA et al., 1979) com modificações (ROSSATO et al., 2002). Em resumo, a mistura reacional continha 200 µl de homogenato de testículo ou padrão (MDA 0,03 mM), 200 µl de 8,1% d Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 750 µl de solução de Ácido Acético (2,5 M HCl, pH 3,5) e 750 µl de 0,8% de TBA. As misturas foram aquecidas a 95 °C por 90 minutos. Após a centrifugação a 1.700 g por 5 minutos, as absorbâncias foram mensuradas a 532 nm. Os níveis teciduais de MDA foram expressos como nmol MDA/mg de proteína.

A concentração de proteína foi mensurada pelo método do Azul de Comassie (BRADFORD, 1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

Os resultados foram apresentados como média e \pm erro padrão da média (S.E.M. – Standard Error of the Mean) do total de experimentos de acordo com os grupos. A significância estatística foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado como representando uma diferença significativa em todos os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote de *software* GraphPad Prism[®] 5.

A execução do experimento se mostrou bem-sucedida uma vez que o tipo de aplicação do EAA ou do seu veículo (óleo de oliva) intramuscular no volume calculado (0,2 mL) não causaram maiores desconfortos aos animais. Da mesma forma, a manipulação para aplicação das injeções semanalmente foi bem tolerada durante todo o período experimental. Além disso, a solução para aplicação do hCG ou de seu veículo (solução salina) foram bem tolerados

desde que a temperatura das soluções estivesse próxima dos 37 °C, dessa maneira, a observação quanto a essa demanda foi respeitada. Nenhum animal veio a óbito ou teve que ser retirado do experimento e nenhuma intercorrência foi observada.

Em relação à avaliação inflamatória, entre os animais dos grupos “prevenção” (Grupos II, III e IV), o uso de hCG nas doses de 50 e 200UI durante as aplicações de BOL foi benéfico quando comparado com os animais que não receberam a gonadotrofina e foram mantidos para reversão pela espermatogênese (Grupo VIII) (Grupo III vs. Grupo VIII = $0,2288 \pm 0,1634$ e Grupo IV vs. Grupo VIII = $0,4198 \pm 0,1634$, respectivamente). Esse dado reforça a importância do tratamento com hCG para prevenir a lesão testicular, além da retirada do EAA, somente (Figura 1A).

Na avaliação da peroxidação lipídica, entre os animais que não receberam hCG, verificou-se que o período de 8 semanas após as administrações de BOL foi benéfico em relação aos níveis de TBARS. Os animais desse grupo produziram menores níveis de MDA quando comparados com os animais que receberam BOL e placebo de hCG (Grupo II vs. Grupo VIII = $0,3633 \pm 0,04608$) (Figura 1B).

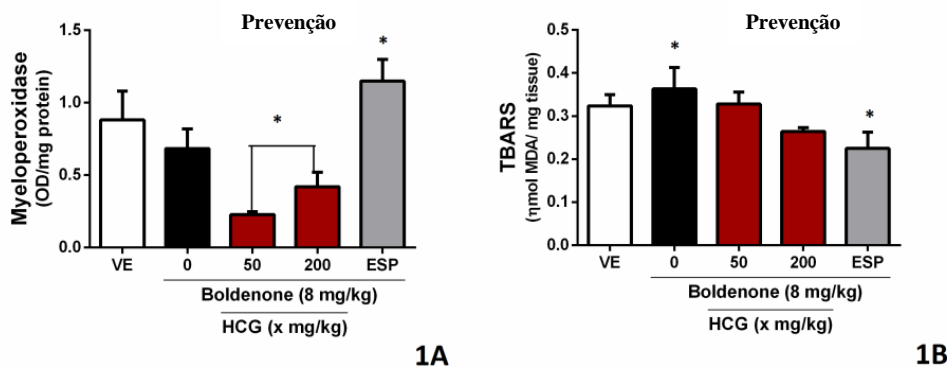


Figura 1 – **1A:** Níveis de mieloperoxidase (MPO) expressos em OD/mg de proteína em testículos de ratos comparados entre os animais do grupo “prevenção” (III e IV) e os animais do grupo “espermatogênese” (VIII). Grupos I, II, III, IV e VIII. **1B:** Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em nmol de MDA/mg de tecido em testículos de ratos comparados entre os animais do grupo “prevenção” III e IV) e os animais do grupo “espermatogênese” (VIII). Grupos I, II, III, IV e VIII. Legendas: **BOL:** Undecilenato de Boldenona; **hCG:** Gonadotrofina Coriônica Humana; **VE:** veículo, grupo Controle ou Grupo I; **0:** Ciclo BOL + Placebo de hCG ou Grupo II; **50:** Ciclo BOL + hCG50 ou Grupo III; **200:** Ciclo BOL + hCG200 ou Grupo IV; **ESP:** Reversão BOL/Espermatogênese ou Grupo VIII.

Entre os animais dos grupos “reversão” (Grupos V, VI e VII), não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos tanto em relação à avaliação inflamatória (MPO) quanto em relação à avaliação de estresse oxidativo (TBARS) (Figuras 2A, 2B). Esses dados sugerem que, após a instalação da lesão oxidativa e do dano inflamatório, a administração de

hCG nas doses estudadas não foi capaz de reverter de forma significativa os parâmetros avaliados.

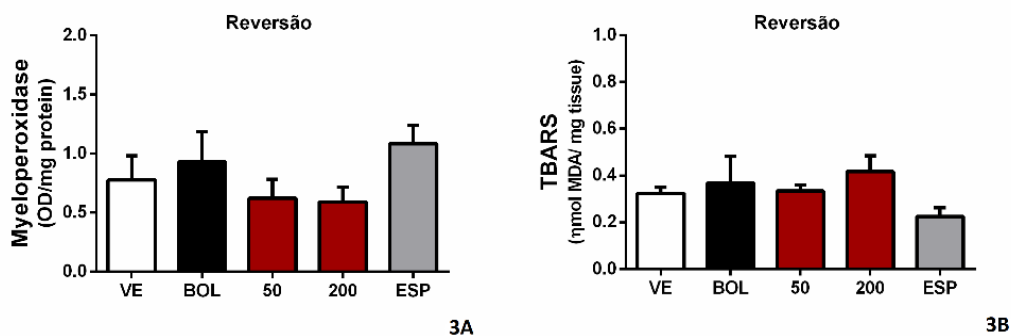


Figura 2 – **2A:** Níveis de mieloperoxidase (MPO) expressos em OD/mg de proteína em testículos de ratos comparados entre os animais do grupo “reversão” (V e VI) e os animais do grupo “espermatogênese” (VIII). Grupos I, V, VI, VII e VIII. **2B:** Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em η mol de MDA/mg de tecido em testículos de ratos comparados entre os animais do grupo “reversão” (V e VI) e os animais do grupo “espermatogênese” (VIII). Grupos I, V, VI, VII e VIII. Legendas: **BOL:** Undecilenato de Boldenona; **hCG:** Gonadotrofina Coriônica Humana; **VE:** véculo, grupo Controle ou Grupo I; **BOL:** Reversão BOL + Placebo de hCG ou Grupo VII; **50:** Reversão BOL + hCG50 ou Grupo V; **200:** Reversão BOL + hCG200 ou Grupo VI; **ESP:** Reversão BOL/Espermatogênese ou Grupo VIII.

Undecilenato de Boldenona é reconhecidamente um hormônio anabólico esteroide sintético causador de distúrbios testiculares com prejuízos nas funções reprodutivas (ODA et al., 2012). Sendo o testículo um órgão rico em lipídios e suas células ricas em mitocôndrias, essas características tornam o órgão reprodutor masculino um alvo fácil para o ataque das espécies reativas de oxigênio. Um parâmetro indicativo de infiltração de células inflamatórias, mais especificamente de neutrófilos polimorfonucleares, é a MPO (KLINKE et al., 2011). A MPO também funciona como o principal catalisador enzimático para o início da peroxidação lipídica em locais de inflamação (ZHANG et al., 2002). Desta forma, MPO e peroxidação lipídica são bons indicadores de início de lesão testicular causada por desequilíbrio entre os mecanismos oxidantes/antioxidantes.

Os níveis de MPO encontrados nesse estudo demonstraram que o tratamento com a gonadotrofina (hCG) foi benéfico enquanto administrada concomitantemente com o EAA. De fato, pesquisas relatam o efeito protetor ao dano testicular com o uso de hCG sendo administrado em ciclos juntamente com algum esteroide anabolizante (COVIELLO et al., 2005; HSIEH et al., 2013). Apesar da retirada do EAA e a manutenção dos animais por 60 dias para que o processo de reversão pela espermatogênese ocorresse, como citado por RUSSEL e colaboradores (1990), os níveis de MPO se mantiveram elevados, indicando que a migração de células inflamatórias já havia ocorrido para o local e, desta forma, a sinalização

para o início do processo de lesão. Apesar de não ter havido elevação significativa nos níveis de MPO nos animais dos grupos “reversão”, uma tendência a diminuição nesses níveis também pôde ser observada nos animais tratados com hCG, indicando o efeito benéfico da gonadotrofina.

Bueno e colaboradores (2017), observaram níveis de MPO significativamente aumentados após a administração de BOL em protocolos de doses baixas de BOL por períodos de três meses bem como protocolos de doses intermediárias por período de dois meses. Esses dados puderam ser validados por meio da avaliação histopatológica que indicou lesão testicular nos mesmos protocolos em que houve maior aumento nos níveis de MPO. Até então, esse é o único trabalho que associou níveis de MPO com lesão testicular e, de acordo com os dados preliminares aqui apresentados, essa enzima pode ser considerada um marcador preciso para dano testicular.

A possível explicação para a não diminuição nos níveis de MPO no grupo reversão pela espermatogênese pode ser devido ao comportamento de liberação dessa proteína, pois, uma vez que os neutrófilos sejam ativados, eles liberam MPO (KLINKE et al., 2011). Com a migração de polimorfonucleares ativados para os testículos, essas células já terão liberado MPO, não sendo, portanto, possível uma atenuação do processo inflamatório pela via hormonal, mas provavelmente, o restabelecimento do ambiente testicular se dê pela via anti-inflamatória.

As membranas das células somáticas testiculares são altamente suscetíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (BAS; KALENDER, 2016). Com isso, o estresse oxidativo no ambiente testicular desempenha um papel importante na etiologia de espermatozoides com morfologia defeituosa, função, contagem espermática e infertilidade masculina (ACHARYA et al., 2008). A mensuração de MDA pode ser uma ferramenta diagnóstica útil para estimar o estresse oxidativo (BAS; KALENDER, 2016). O MDA é um dos produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), portanto, é esperado que altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sejam encontradas para contribuir com o dano induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (AITKEN; SAWYER, 2003; AITKEN et al., 2006; AITKEN; BAKER, 2008). No presente estudo, observou-se que apesar de não ter havido diferença significativa na diminuição dos níveis de TBARS nos animais tratados com hCG durante o tratamento com EAA (grupo “prevenção”), uma tendência a diminuição desses níveis foi encontrada.

De forma semelhante, uma diminuição significativa na produção de MDA foi verificada nos animais que não receberam hCG e foram mantidos por 60 dias sem nenhum tipo de tratamento (grupo VIII). Esses dados sugerem que apesar da lesão com provável migração de neutrófilos, como demonstrado em relação aos níveis de MPO no grupo VIII, a interrupção do tratamento com EAA pôde ser benéfica uma vez que os níveis de TBARS diminuíram consideravelmente. Como é de se esperar, o sistema de defesa antioxidante provavelmente foi capaz de restabelecer o equilíbrio no estado redox testicular, pois, como se sabe, o testículo possui uma matriz de defesa antioxidante sofisticada tanto enzimática como não enzimática visando lidar com o risco de desequilíbrio ao qual o órgão está sujeito (AITKEN; ROMAN, 2006).

Esses dados estão de acordo com o estudo de Bueno e colaboradores (2017), no qual aumento nos níveis de MDA foi encontrado apenas no protocolo de maior tempo de exposição à BOL e ao estanozolol. O protocolo citado teve uma duração de 12 semanas ao passo que o protocolo adotado no presente estudo teve duração de 8 semanas, porém a dose administrada foi maior do que a do estudo citado. Verificou-se que a dose administrada de 8 mg/kg semanalmente foi suficiente para causar um desequilíbrio no *status* oxidativo com geração de MDA e, assim como encontrado por outros pesquisadores, a administração de uma fonte de testosterona exógena é capaz de aumentar consideravelmente a peroxidação lipídica testicular (MOHAMED et al., 2015). A observação de diminuição nos níveis de TBARS foi observada no grupo VIII, porém, ausência de diferença significativa entre o grupo “reversão” se deveu ao menor aumento de TBARS entre os animais do grupo VII.

A análise conjunta dos dados permite afirmar que o uso de Gonadotrofina Coriônica Humana foi eficaz na prevenção da peroxidação lipídica testicular em animais que receberam a administração do hormônio em conjunto com o tratamento com Undecilenato de Boldenona. O mecanismo pelo qual a peroxidação lipídica foi diminuída se deveu à diminuição dos níveis de MPO no ambiente testicular uma vez que o início da peroxidação lipídica se dá com a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão. Animais tratados com hCG em concomitância com o EAA foram mais beneficiados do que os animais que foram tratados após o período de administração da Boldenona, destacando o papel do hCG na prevenção das lesões induzidas pela BOL.

Referências

- ACHARYA, U.R.; MISHRA, M.; PATRO, J.; PANDA, M.K. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. **Reproductive Toxicology**, v.25, p.84-88, 2008.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, n.4, p.829-843, 2003.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. **International Journal of Andrology**, v.31, p.295-302, 2008.
- AITKEN, R.J.; SAWYER, D. The human spermatozoon – not waving but drowning. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.518, p.85-98, 2003.
- AITKEN, R.J.; SKAKKEBAEK, N.E.; ROMAN, S.D. Male reproductive health and the environment. **The Medical Journal of Australia**, v.185, p.414-415, 2006.
- BAS, H.; KALENDER, S. Antioxidant Status, Lipid Peroxidation and Testis-histoarchitecture Induced by Lead Nitrate and Mercury Chloride in Male Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, p.1-9, 2016.
- BASARIA, S. et al. Adverse Events Associated with Testosterone Administration. **The New England Journal of Medicine**, v.363, p.109-122, 2010.
- BATTISTA, V. et al. Asynchronous Bilateral Achilles Tendon Ruptures and Androstenediol Use. **The American Journal of Sports Medicine**, v.31, n.6, 2003.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-154, 1976.
- BUENO, A. et al. Impacts of dose and time of boldenone and stanazolol exposure in inflammatory markers, oxidative and nitrosative stress and histopathological changes in the rat testes. **Theriogenology**, v.90, p.101-108, 2017.
- CANIZZO, F.T. et al. Pathology of the testicle and sex accessory glands following the administration of boldenone and boldione as growth promoters in veal calves. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, n.11, p.1109-1116, 2007.
- CHAINY, G.B.; SAMANTARAY, S.; SAMANTA, L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. **Andrologia**, v.29, n.6, p. 343-349, 1997.

CLARK, A.S.; HENDERSON, L.P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.27, p.413-436, 2003.

COVIELLO, A.D. et al. Low-Dose of Human Chorionic Gonadotropin Maintains Intratesticular Testosterone in Normal Men with Testosterone-Induced Gonadotropin Suppression. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, n.5, p.2595-2602, 2005.

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

EVANS, N.A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v.32, n.2, p.534-542, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v.8, n.2, p.89-193, 1985.

HANDELSMAN, D.J. Testosterone: use, misuse and abuse. **The Medical Journal of Australia**, v.185, n.8, p.436-439, 2006.

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

HSIEH, T.C. et al. Concomitant intramuscular human chorionic gonadotropin preserves spermatogenesis in men undergoing testosterone replacement therapy. **The Journal of Urology**, v.189, n.2, p.647-650, 2013.

KLINKE, A. et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**, v.117, n.4, p.1350-1358, 2011.

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

MOHAMED, R.H. et al. Antiapoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. **Gene**, v.561, p.107-114, 2015.

MOHD MUTALIP, S.S. et al. Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nadrolone, and stanazolol. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.11, n.8, p.653-658, 2013.

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

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p. 351-358, 1979.

PARSSINEN, M.; SEPPALA, T. Steroid use and long-term health risks in former athletes. **Sports Medicine**, v.32, p.83-94, 2002.

ROSSATO, J.I. et al. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, v.27, p.297-303, 2002.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. The classification and timing of spermatogenesis. In: ____ (Eds.). **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache Rivers Press, 1990. p.41-58.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v.23, n.6, p.737-752, 2002.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v.91, n.3, p.31-38, 1991.

SOMA, L.R. et al. Pharmacokinetics of boldenone and stanozolol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in race horses and nonrace horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.30, n.2, p.101-108, 2007.

STRAHM, E. et al. Influence of multiple injections of human chorionic gonadotropin (hCG) on urine and serum endogenous steroids concentrations. **Forensic Science International**, v.213, n.1-3, p.62-72, 2011.

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic—androgenic steroid in male rats. **Endocrine Journal**, v.51, n.4, p.425-434, 2004.

TÓTHOVÁ, L. Effects of exogenous testosterone on oxidative status of the testes in adult male rats. **Andrologia**, v.45, n.6, p.417-423, 2013.

TOUSSON, E.; ALM-ELDEEN, A.; EL-MOGHAZY, M. p53 and Bcl-2 expression in response to boldenone induced liver cells injury. **Toxicology and Industrial Health**, v.27, n.8, p.711-718, 2011.

TOUSSON, E. et al. Histopathological and immunohistochemical changes in the testes of rabbits after injection with the growth promoter boldenone. **Reproductive Sciences**, v.19, n.3, p.253-259, 2012.

TOUSSON, E. et al. Physiological and biochemical changes after boldenone injection in adult rabbits. **Toxicology and Industrial Health**, v.32, n.1, p.177-182, 2016.

VELAZQUEZ, I.; ALTER, B.P. Androgen and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. **American Journal of Hematology**, v.77, n.3, p.257-297, 2004.

ZHANG, R. et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.48, p.46116-46122, 2002.

ZITZMANN, M.; NIESCHLAG, E. Hormone substitution in male hypogonadism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.161, n.1-2, p.73-88, 2000.

4 DISCUSSÃO

Por meio deste estudo foi possível verificar os efeitos hepáticos e testiculares mediante o uso de dois esteroides androgênicos anabolizantes: Undecilenato de Boldenona para testículos e fígado; Estanazolol para fígado. Ambos os anabolizantes foram eficazes na produção de lesão nos órgãos estudados e os animais submetidos ao estudo toleraram a manipulação durante o período experimental, de forma que nenhum animal foi perdido ou excluído dos grupos. A compilação dos estudos permitiu a dissertação de dois artigos científicos (Artigos 1 e 2).

No Artigo 1, a investigação de três diferentes protocolos de exposição a esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) variaram em dose e período de exposição. O propósito desses protocolos visava mimetizar tratamentos utilizados por homens com o intuito de aumentar os ganhos anabólicos enquanto se diminui ao máximo os efeitos androgênicos. Desta maneira, o Protocolo I mimetizou um esquema de diminuição do período de exposição aos EAA Undecilenato de Boldenona e Estanazolol, aumentando a dose administrada; o Protocolo II buscou reproduzir a terapia convencional indicada, preservando a dose e o tempo recomendados; o Protocolo III se baseou na tentativa de redução dos efeitos androgênicos causados pelas altas doses, reduzindo a dose e aumentando o tempo de exposição. De fato, um efeito diferenciado foi observado nos marcadores de estresse oxidativo, antioxidantes, inflamatórios e metabólicos.

No primeiro manuscrito, a avaliação das enzimas do sistema antioxidante demonstrou alteração no sistema das glutations nos Protocolos II e III, sendo que um aumento na atividade de glutaciona peroxidase (GPx) acompanhado de uma redução na atividade de glutaciona redutase (GR) foram observados no protocolo II. Em contraste o protocolo III levou a reduções nas atividades de todas as enzimas do sistema glutations. Desta forma, pôde-se inferir que o sistema glutations se tornou mais ativo no protocolo de maior tempo de exposição em contraste com o protocolo I, no qual outra linha de defesa antioxidante se tornou mais ativa.

As reduções observadas nas atividades da enzima superóxido dismutase (SOD) nos protocolos I e II em contraste com o aumento da enzima catalase (CAT) nesses mesmos protocolos, demonstra um possível aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse desequilíbrio do estado oxidativo foi corroborado por outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa no qual um aumento de ROS e de peroxidação lipídica foram observados sob esse mesmo protocolo (DORNELLES et al., 2017). A explicação para o

comportamento das enzimas é de que este aumento de ROS e de TBARS ultrapassou a capacidade da SOD de neutralizar os oxidantes e, conseqüentemente, ativou a CAT. A importância da avaliação desse comportamento enzimático deve ser observada, pois houve uma evidência de que o abuso de EAA pode causar a depleção da capacidade antioxidante do fígado. Além disso, pôde-se observar que o protocolo III recrutou o sistema glutathionas indicando que o acúmulo de ROS não foi suficiente para induzir a atividade da SOD. A reconhecida capacidade hepática de regeneração pôde ser observada com a provável adaptação frente ao protocolo III, no qual houve uma exposição contínua aos EAA.

O comportamento dos marcadores inflamatórios mieloperoxidase (MPO) e NAGase indicou infiltrado de células inflamatórias somente no Protocolo I, acompanhando o aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) neste protocolo. Células que realizam fagocitose em estado ativado exibem elevados níveis de H_2O_2 e sua infiltração, como indicado no protocolo I, pode aumentar os níveis de H_2O_2 . Essa dinâmica induz aumento no estresse oxidativo e, conseqüentemente, altera as atividades de CAT e SOD hepáticos, conforme observado nos resultados deste artigo.

Os marcadores metabólicos glicogênio e lactato sofreram alterações menos substanciais, uma vez que o órgão apesar de danificado com o ataque das ERO, continuava em funcionamento. Esse funcionamento pôde ser verificado pelos parâmetros avaliados neste artigo científico bem como pelos parâmetros avaliados por Dornelles e colaboradores (2017), que avaliou atividade enzimática tais como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e albumina. Os níveis de lactato estiveram diminuídos sob os três protocolos estudados, enquanto que os níveis de glicogênio diminuíram apenas sob o protocolo I indicando que o protocolo de maior dose e menor tempo foi o mais deletério uma vez que demonstrou mal funcionamento do fígado.

No artigo 2, dois grandes grupos foram criados com o intuito de se mimetizar tratamento com reversão utilizando-se a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) ou prevenção com o mesmo hormônio diante da injúria testicular com Undecilenato de Boldenona (BOL). Diante dos protocolos criados, avaliamos um parâmetro de estresse oxidativo e outro de infiltração de células inflamatórias, sendo eles, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e mieloperoxidase (MPO). Como demonstrado por ZHANG e colaboradores (2002), a MPO funciona como um catalisador enzimático para que ocorra o início da peroxidação lipídica em locais de inflamação. Sendo assim, a avaliação desses dois

marcadores conjuntamente foi julgada como um bom método de verificação quanto à lesão testicular.

Pôde-se verificar no segundo manuscrito que o tratamento com hCG nas duas doses utilizadas (50 e 200 UI) foi benéfico quando utilizado na forma de “ciclos” ou seja, de forma concomitante com a administração de BOL uma vez que os níveis de MPO diminuíram significativamente nessa situação. Os nossos resultados quanto a este marcador estão de acordo com o relatado por Coviello e colaboradores (2005) bem como por Hsieh e colaboradores (2013) que demonstraram um efeito protetor da hCG ao dano testicular induzido por EAA. Da mesma forma, Bueno e colaboradores (2017) observaram níveis significativamente aumentados de MPO em protocolos de maior duração com doses mais baixas de BOL.

Uma diminuição, apesar de não significativa, foi observada de forma marcada principalmente no protocolo do grupo “prevenção” que recebeu hCG na sua dose mais elevada. Da mesma forma, diminuição significativa de peroxidação lipídica foi observada em animais que receberam BOL e foram mantidos por 60 dias sem nenhum tipo de tratamento. A avaliação desses dados permitiu inferir que o mecanismo pelo qual a peroxidação lipídica diminuiu com o uso de hCG se deveu à diminuição dos níveis de MPO, uma vez que a peroxidação lipídica inicia-se com a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão.

5 CONCLUSÕES

Após as análises obtidas dos experimentos realizados, conclui-se que:

1. O protocolo I foi o mais deletério por ter causado uma diminuição na capacidade antioxidante da primeira linha de defesa, maior infiltração de células inflamatórias e, conseqüentemente, maiores acúmulos de peróxido de hidrogênio nos tecidos hepáticos.
2. O protocolo I demonstrou desequilíbrio no estado metabólico, com reduções no lactato e glicogênio, indicando pior funcionamento do órgão em protocolos de períodos mais curtos, porém com doses mais altas de EAA.
3. O uso de EAA por períodos mais longos e doses menores está mais associado a alterações no sistema das glutationsas.
4. Apesar do protocolo pesquisado, mudanças no conteúdo de glicogênio e lactato estiveram presentes.
5. Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) nas doses de 50UI e 200UI foi capaz de prevenir peroxidação lipídica testicular em animais que receberam Undecilenato de Boldenona.
6. Animais tratados com hCG em concomitância com Undecilenato de Boldenona foram mais beneficiados quanto à prevenção de infiltração de células inflamatórias quando comparado com animais que receberam o hormônio após um período de tratamento com fonte de testosterona exógena.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKEY, J.L. et al. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). **Hormones and Behavior**, n.42, p.448–460, 2002.
- ALTIERI, P. et al. Testosterone antagonizes doxorubicin-induced senescence of cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v.8, n.5, p.1-13, 2016.
- ART T, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. n. 36, p. 298-302, 2006.
- AYDILEKN., AKSAKAL M e KARAKILCIK AZ. Effects of testosterone and vitamin E on the antioxidant system in rabbit testis. **Andrologia**. v.36, p.277–281, 2004.
- BASARIA, S.; WAHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.11 (86), p. 5108–5117, 2001.
- BAYON, J. E. et al. Effects of Stanazolol and L-Carnitine on Erythrocyte Osmotic Fragility During Aerobic Exercise in Rats. **Comparative Hematology International**, v.3, p.196-200, 1993.
- BERTHOLD, A. Transplantation der Hoden. **Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medizin**, v. 42, 1849.
- BING O et al. High doses of testosterone increase anticonflict behaviour in rat. **Eur Neuropsychopharmacol**.v.8, p.321–323, 1998.
- BITRAN D, KELLOGG CK; HILVERS RJ. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA_A receptors in the rat. **Hormones and Behavior**, n.27, v.4,p.568–583, 1993.
- BORST, S.E. et al. Testosterone administration induces protection against global myocardial ischemia. **Hormone and Metabolic Research**, v.42 (2), p.122–129, 2010.
- BOWERS, L.D. Abuse of performance-enhancing drugs in sport. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.24 (1), p.178-181, 2002.
- BOYADJIEV, N.P. et al. Reversible hypogonadism and azoospermia as a result of anabolic androgenic steroid use in a bodybuilder with personality disorder. A case report. **The Journal Sports Medicine and Physical Fitness**, v.40, p.174–271, 2000.
- BROWN-SÈQUARD, C.E. The effects produced on man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. **The Lancet**, v.2, p.105-107, 1889.
- BUTENANDT, A.; HANISCH, G. Über Testosterone. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholestrin. Hoppe Seylers. **Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v.237, p.89, 1935.

CALOF, O.M. et al. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: A meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. **The Journal of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.60, p.1451–1457, 2005.

CANNIZZO, F.T. et al. Pathology of the testicle and sex accessory glands following the administration of boldenone and boldione as growth promoters in veal calves. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, p.1109–1116, 2007.

CARVALHO, FB., et al., Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **J Nutr Biochem**. n.26, v. 4, p. 378-390, 2015.

CHAINY GBN, SAMANTARAY S e SAMANTA L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. **Andrologia**. v.29, p.343-349, 1997.

CHUNG HT et al. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.282, p.1075–1079, 2001.

CATO, A.C.; NESTL, A., MINK, S. Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular Signaling Pathways. **Science Signaling**, v.138 (9): 1–11, 2002.

CLARK, A.S.; HARROLD, E.V.; FAST, A.S. Anabolic–androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Hormones and Behaviour**, v.31, p.35–46, 1997.

CLARK AS e HENDERSON LP. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neurosci Biobehav Rev**.n.27, v.5,p. 413–436, 2003.

CLARK AS, MITRE MC e BRINCK-JOHNSEN T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. **Brain Res**.n.679, p.64–71, 1995.

COERT, A. et al. The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen. **Acta Endocrinologica**, v.79, p.789–800, 1975.

COVIELLO, A.D. et al. Low-Dose of Human Chorionic Gonadotropin Maintains Intratesticular Testosterone in Normal Men with Testosterone-Induced Gonadotropin Suppression. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, n.5, p.2595-2602, 2005.

DAINTITH, J.; GJERTSEN, D. Oxford Dictionary of Scientists. Oxford: Oxford University Press, p. 468, 1999.

DELGADO, J.; SABORIDO, A.; MEGÍAS, A. Prolonged treatment with the anabolic-androgenic steroid stanozolol increases antioxidant defences in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v66, p.63-71. 2010.

DURDIAKOVA, J.; OSTATNIKOVA, D.; CELEC P. Testosterone and its metabolites -- modulators of brain functions. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 4, n.71, p. 434-454, 2011.

DUTTA D. et al. Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. **Circulation Research**, v.110 (8), p.1125–1138, 2012.

EVANS-BROWN, M.J.; MCVEIGH, J. An introduction to anabolic steroids. **SportEXmedicine**, v.38, p.20–26, 2008.

EVANS, N.A. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v.2 (32), p. 534–542, 2004.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, v.52 (4), p.513–556, 2000.

FLEMING, M.D. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. Hematology. **American Society of Hematology Education Program**, p.151–158, 2008.

FERNÁNDEZ-BALSELLS, M.M. et al. Clinical review 1: Adverse effects of testosterone therapy in adult men: A systematic review and meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.95, p.2560–2575, 2010.

FREEMAN, E.R.; BLOOM, D.A.; MCGUIRE, E.J. A Brief History of Testosterone. **The Journal of Urology**, v.165, p.371-373, 2001.

GARCIA M.C et al. The effects of stanozolol and boldenone undecylenate on plasma testosterone and gonadotropins and on testis histology in pony stallions. **Theriogenology**, v.28, p.109–119, 1987.

GRAHAM, M.R. et al., Anabolic Steroid Use: Patterns of Use and Detection of Doping. **The Journal of Sports Medicine**, v.38 (6), p.505-525, 2008.

GROOT, M.; BIOLATTI, B. Histopathological effects of boldenone in cattle. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 51, p.58–63, 2004.

HAAS, L.F. Neurological Stamp: Charles Edouard Brown-Sèquard (1818-1894). **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v.64 (1), p.89, 1998.

HALL, R.C.; HALL, R.C. Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. **The Southern Medical Journal**, v. 98, p.550–555; 2005.

HANDELSMAN, D.J. Androgen action and pharmacologic uses. In: DEGROOT, L.J.; JAMESON, J.L., eds. *Endocrinology*. WB Saunders: Philadelphia, p.2232–2242, 2000.

HANDELSMAN, D.J.; HEATHER, A. Androgen abuse in sports. **Asian Journal of Andrology**, v.3 (10), p.403– 415, 2008.

HOBERMAN, J. M.; YESALIS, C. E. The history of synthetic testosterone. **Scientific American**, v. 272, p.76, 1995.

IARC Monograph (1987). Monograph of International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf>

- IKEDA, Y. et al. Androgen receptor counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity in male mice. **Molecular Endocrinology**, v.24 (7), p.1338–1348, 2010.
- JAROW, J.P.; LIPSHULTZ, L.I. Anabolic steroid-induced hypogonadotropic hypogonadism. **American Journal of Sports Medicine**, v.18, p.429–431, 1990.
- JANJIC, M.M., et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptosis and NOS2 (nitric-oxide synthase 2) in adult rat Leydig cells following in vivo exposure. **Reprod Toxicol.** n 34, v.4, p. 686-693, 2012.
- JAY, V. A portrait in history: the extraordinary international career of Dr. Brown-Séquard. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, **123**: 662, 1999
- KALAT, J. W. Biological Psychology. New York: Brooks/Cole, p. 298–306, 1998.
- KARILA, T.; HOVATTA, O.; SEPPÄLÄ, T. Concomitant abuse of anabolic androgenic steroids and human chorionic gonadotrophin impairs spermatogenesis in power athletes. **International Journal of Sports Medicine**, v.25, p.257–263, 2004.
- KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v.154 (3), p.502-521, 2008.
- KOCH, J.J. Performance-enhancing: substances and their use among adolescent athletes. **Journal of Pediatrics Review**, v.23, n.9, p.310-317, 2002.
- KOCHAKIAN, C. D. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.143, p. 359-363, 1993.
- LECHAGO, J. The Endocrine Cells of the Digestive Tract. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.11(1), p.63-70, 1987.
- LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.11, p.26087-26124, 2015.
- LUMIA, A.R.; MCGINNIS, M.Y. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. **Physiology & Behavior**, n.100, p.199-204, 2010.
- MCGINNIS, M.Y. Anabolic androgenic steroids and aggression: studies using animal models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.1036, p.399-415, 2004.
- MILGROM, E. Steroid Hormones. In: BAULIEU, E-E; KELLY, P.A., eds. *Hormones: From Molecules to Disease*. Paris: Hermann, p.385-442, 1990.
- MINKIN DM, MEYER ME; VAN HAAREN F. Behavioral effects of long term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav.** n.44, p.959–963, 1993.
- NIEHANS, P. Introduction to Cellular Therapy. New York: Pageant Books, p.9, 1960.

NIESCHLAG, E. et al. Plasma androgen levels in men after oral administration of testosterone or testosterone undecanoate. **Acta Endocrinologica**, v.79, p.366–374, 1975.

O'BRYAN MK, et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. **Biology of Reproduction**.v.63, p.1285–1293, 2000

ODA S. S.; EL-ASHMAWY I. M. Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. **International Journal of Experimental Pathology**, n. 93, p.172–178, 2012.

PALACIOS, A. et al. Effect of testosterone enanthate on hematopoiesis in normal men. **Fertility and Sterility**, v.40, p.100–104, 1983.

PONGKAN, W.; CHATTIPAKORN, S.C.; CHATTIPAKORN, N. Roles of testosterone replacement in cardiac ischemia-reperfusion injury. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v.21 (1), p.27–43, 2015.

PLUMB, D. C. **Plumb's Veterinary Drug Handbook**. 5. ed. Blackwell Scientific Pub Professional. p. 134-135, 2005.

RAHNEMA, C.D. et al. Anabolic steroid-induced hypogonadism: diagnosis and treatment. **Fertility and Sterility**, v.101, n.5, p.1271-1279, 2014.

RAYNER, B.S., LOVE D T, HAWKINS C L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free Radic Biol Med**.v. 71, p. 240-255, 2014.

SABORIDO, A. et al. Stanazolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v: 110, p.661-669, 2011.

SALAS-RAMIREZ KY, MONTALTO PR, SISK CL. Anabolic steroids have long-lasting effects on male social behaviors. **Behav Brain Res**. n.208, p. 328-335, 2010.

SAUDAN, C.; BAUME, N.; ROBINSON, N.; AVOIS, L.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Testosterone and doping control. **British Journal of Sports Medicine**, v.40, p.21-24, 2006.

SCHREIJER, A.J.; REITSMA, P.H.; CANNEGIETER, S.C. High hematocrit as a risk factor for venous thrombosis. Cause or innocent bystander? **Haematologica**, v.95, p.182–184, 2010.

SKOGASTIERNA, C. et al. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. **European Journal of Preventive Cardiology**, v.21 (8), p.1049–1054, 2014.

STOLKER, A.A. et al. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. **Trends Analytical Chemistry**, v.26, p.967-979, 2007.

SCHÄNZER, W.; OPFERMANN, G.; DONIKE, M. Metabolism of stanozolol: Identification and synthesis of urinary metabolites. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.36, p.153-174, 1990.

SHAHIDI, N.T. Androgens and erythropoiesis. **The New England Journal of Medicine**, v.289, p.72–80, 1973.

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

SJÖQVIST, F.; GARLE, M.; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **The Lancet**, n.371, p.1872–1882, 2008.

SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Hormone therapy for control of reproduction in mares and stallions. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 3, p. 81–100, 1987.

SQUIRES, E.L. et al. Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallion. **Journal of Animal Science**, v.54, p.576–582, 1982.

SMITH ST, STACKMAN RW; CLARK AS. Spatial working memory is preserved in rats treated with anabolic-androgenic steroids. **Brain Res**. n.737, p.313–316, 1996.

STARLING, E.H. The Croonian Lectures. I. On the chemical correlation of the functions of the body. **The Lancet**, v.166, p. 339-341, 1905.

TAUSK, M. Androgens and anabolic steroids. In: Discoveries in Pharmacology. Haemodynamics, Hormones, and Inflammation. Edited by PARNHAM, M. J.; Bruinvels, J. Amsterdam: Elsevier, v. 2, p. 307–319, 1984.

TENOVER, J.S. Effects of testosterone supplementation in the aging male. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.75, p.1092–1098, 1992.

THABET, N.S. et al. Effect of the anabolic steroids, boldenone undecylenate on reproductive performance on male rabbits. **J. Reprod. Infertil**.v 1,p. 8–17, 2010.

TANEHKAR, F. et al. Voluntary exercise does not ameliorate spatial learning and memory deficits induced by chronic administration of nandrolone decanoate in rats. **Hormones and Behavior**. v.63 (1), p.158–65, 2013.

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

TOUSSON E. et al. Histopathological and immunohistochemical changes in the testes of rabbits after injection with the growth promoter Boldenone. **Reproductive Sciences**. v.19 (3), p. 253-259, 2012.

TOUSSON, E. et. al. Physiological and biochemical changes after boldenone injection in adult rabbits. **Toxicology an Industrial Health**. p.1-6, 2013.

TOUSSON, E. Histopathological alterations after a growth promoter boldenone injection in rabbits. **Toxicology and Industrial Health**. p.1-7, 2013.

- TUREK, P.J. et al. The Reversibility of Anabolic Steroid-Induced Azoospermia. **The Journal of Urology**, v.153, n.5, p.1628-1630, 1995.
- TURNER, T.T; LYSIAK, J.J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**, v.5, p.488-498, 2008.
- VICTOR, V.M. et al. Mitochondrial impairment and oxidative stress in leukocytes after testosterone administration to female-to-male transsexuals. **The Journal of Sexual Medicine**, v.11 (2), p.454–461, 2014.
- VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons Inc., p.703, 1995.
- YERSALIS, C.E.; BAHRKE, M.S. Anabolic-androgenic steroids. **Sports Medicine**, v.19, p. 326–340, 1995.
- WANG, F. et al. Testosterone replacement attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction. **Journal of Endocrinology**, v.225 (2), p.101–111, 2015.
- WILSON, J.D.; GRIFFIN, J.E. The use and misuse of androgens. **Metabolism**, v. 29, p.1278–95, 1980.
- WINTERBOURN, C.C., M.C. VISSERS, e A.J. KETTLE, Myeloperoxidase. **Curr Opin Hematol**. n.7, v.1, p. 53-58, 2000.
- WINTERBOURN, C.C. e A.J. KETTLE. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxid Redox Signal**, n.18, v.6, p. 642-660, 2013.
- WINTERS, S.J. Androgens: endocrine physiology and pharmacology. **NIDA Research Monographs**, n.102, p.113–30, 1990.
- WYNN, V. Metabolic Effects of Anabolic Steroids. **British Journal of Sports Medicine**, v.9(2), p.60-64, 1975.