



**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical**

**EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA E  
RENAL EM RATOS TREINADOS**

**FILIPE CÁSSIO SILVA DE LIMA**

**Recife/PE, 2016.**



**UFRPE**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical**

**EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA E  
RENAL EM RATOS TREINADOS**

**FILIPE CÁSSIO SILVA DE LIMA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Anísio Francisco Soares**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**FILIPPE CÁSSIO SILVA DE LIMA**

**EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA E  
RENAL EM RATOS TREINADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

**Aprovado em 23 de fevereiro de 2016**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (Orientador) – UFRPE**

---

**Prof. Dr. Álvaro Aguar Coelho Teixeira (Co-orientador) – UFRPE**

---

**Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira – Departamento de Fisiologia/ UFPE**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira- DMFA/ UFRPE**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela sabedoria, por colocar nessa jornada pessoas boas e iluminadas que me ajudaram com dicas, pequenos gestos e palavras de incentivo, além de me abrir os olhos e afastar pessoas com finalidade de causar desequilíbrio e o mal.

Aos professores Anísio Soares pelas oportunidades, experiências e desafios em quatro anos de trabalho; Álvaro Aguiar pela orientação na parte histológica e por ter aceitado a parceria; e ao grande “Avatar” Ariosto Afonso pelas palavras de incentivo e apoio, uma vez que desistir do mestrado estava nos meus planos, mas continuei até o fim por causa dele.

Agradeço a família pela paciência e companheirismo à Isolda Virgínia (mãe), Gilson Davi (padrasto) e em especial, Fernanda Érica (irmã).

Amigos: Luciana da Silva Oliveira pelo apoio nas horas de dificuldades e pelas palavras de incentivo; amigos de pós-graduação Erinaldo Santos e Adriano Silva pelo companheirismo e momentos de descontração. Equipe da histologia em especial Solange Bezerra da Silva por todos os ensinamentos de técnicas laboratoriais e manejo de animais de laboratório, Welma Emídio pelas dicas de técnicas de inclusão e coloração necessários para a realização do trabalho Ismaela Melo pelos protocolos e auxílios nas dúvidas e execução de métodos e Clóvis Lapa pela execução de etapas no processo histológico e esclarecimentos. Equipe do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/DMFA Renata Carneiro e Marcos André pelos conselhos e disponibilidade de ajuda quando precisei. Bolsistas de Iniciação Acadêmica Christye Taiany e Joésili e bolsistas PIBIC-EM Mayara Albuquerque e Luene Paz, pelos trabalhos desenvolvidos em 2015 e pela assistência nos experimentos. A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelas oportunidades, espaços de convivência e locais de estudo a que me foram cedidos. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical por todo suporte fornecido e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, por financiar o projeto e o andamento dos experimentos.

Posso não citar todos, mas aqueles que torceram por mim nessa jornada, seja com uma palavra de conforto ou incentivo estarão guardados pra sempre.

## RESUMO

Os Esteroides anabólicos androgênicos (EAA) tiveram um grande aumento em sua utilização por parte dos frequentadores de academias, utilizando-os para fins inapropriados. Tendo em vista a existência de poucos estudos acerca da verificação e efeitos dos EAA em especial o Estanozolol (ST) em rins e fígado, fez-se necessário avaliar possíveis modificações morfofisiológicas sobre esses órgãos ratos *wistar* e sua influência a respeito dos efeitos deletérios. Foram utilizados 32 ratos machos de 60 dias, adultos jovens com peso entre  $230\pm 19$  g, provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (GC), controle-exercício (GCE), tratamento-esteróide (GT) e tratamento-esteróide-exercício (GTE). Os animais pertencentes aos grupos tratamento-esteróide (n16) foram submetido a injeções subcutâneas, 5 dias/semana, em um período de 30 dias, na concentração de 5mg/kg de estanozolol diluído em 1 mL/kg de óleo de gergelim, no qual foi utilizado como veículo. Os animais foram submetidos a natação 20 minutos de atividade por dia, consistindo 5 vezes por semana, durante 4 semanas. Foram avaliados o crescimento e desenvolvimento ponderal, a ingestão líquida e sólida, a diurese, densidade e pH da urina e a histologia renal e hepática. Os resultados mostraram aumento no desenvolvimento ponderal de animais submetidos ao Estanozolol e exercício a partir da 3ª semana de uso e também aumento na excreção urinária nos animais submetidos as mesmas condições; ingestão sólida e ingestão líquida dos animais apresentaram um consumo semelhante entre os grupos durante todo o período de estudo. Na histologia renal dos grupos GT e GTE notou-se glomérulos atrofiados e o túbulo contorcido proximal com presença de material eosinófilo no seu lúmen e congestão na região medular; no GTE, degeneração dos glomérulos e túbulos renais com morfologia alterada e degeneração dos túbulos coletores. No fígado dos animais, do grupo GCE foi observado hepatócitos hipertróficos e redução do espaço do capilar sinusóides, enquanto nos animais dos grupos GT e GTE foi registrado congestão da veia hepática, vacuolização dos hepatócitos e atrofia dos capilares sinusóides. Conclui-se que a administração de Estanozolol na dose de 5,0 mg / kg causou alterações renais e hepáticas em ratos *Wistar*, sugerindo que o ST contribui com efeitos adversos ao organismo de seus consumidores pelo uso indevido.

Palavras-chave: esteroides anabólicos, exercício, estanozolol, morfologia hepática.

## **ABSTRACT**

The anabolic-androgenic steroids (AAS) had a large increase in its use by patrons of academies, using them for inappropriate purposes. Given that there are few studies on the effects of verification and in particular the EAA Stanozolol (ST) in kidney and liver, it was necessary to evaluate possible morphological and physiological changes of these organs Wistar rats and its influence regarding the deleterious effects. We used 32 male rats 60 days, young adults weighing  $230 \pm 19$  g, from the vivarium of the Department of Animal Morphology and Physiology (DMFA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). The animals were randomly divided into four groups: control group (CG), control-year (GCE), treatment-steroid (GT) and treatment-steroid-year (GTE). The animals in treatment groups-steroid (n16) were subjected to subcutaneous injections, 5 days / week, over a period of 30 days at a concentration of 5mg / kg stanozolol diluted in 1 ml / kg of sesame oil, in which it was used as vehicle. The animals were subjected to 20 minutes swimming activity per day, consisting of 5 times per week for 4 weeks. We evaluated the growth and weight development, solid and liquid intake, diuresis, density and pH of the urine, kidney and liver histology. The results showed an increase in the weight development of animals submitted to Stanozolol and exercise from the 3rd week of use and also an increase in urinary excretion in animals undergoing the same conditions; solid and liquid intake intake of animals showed a similar intake between the groups over the entire study period. In renal histology of GT and GTE groups was noted atrophied glomeruli and the proximal convoluted tubule with the presence of eosinophilic material in the lumen and congestion in the spinal region; the GTE, degeneration of the renal glomeruli and tubules with altered morphology and degeneration of the collecting tubules. In the liver of animals, the GCE group was observed hypertrophic hepatocytes and reduced space sinusoid capillary while the animals of GT and GTE groups was recorded congestion hepatic vein, vacuolation of hepatocytes and atrophy sinusoid capillary. We conclude that the administration of Stanozolol at a dose of 5.0 mg / kg caused kidney and liver changes in rats, suggesting that ST contributes side effects to the body of their customers by misuse.

Keywords: anabolic steroids, exercise, stanozolol, liver morphology.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
Capítulo 1.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. ESTEROIDES ANABÓLICO-ANDROGÊNICOS: RELATO GERAL.....	15
2.2. USO DE EAA E ASSOCIAÇÃO COM EFEITOS ADVERSOS.....	17
2.3. IMPACTO DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS SOBRE ADOLESCENTES.....	18
2.4. ESTANOZOLOL: ESTRUTURA QUÍMICA E AÇÃO.....	19
2.5. USO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICO E FUNÇÃO RENAL.....	20
3. REFERÊNCIAS.....	22
Capítulo 2.....	25
EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE AS FUNÇÕES MORFOLOGIA HEPÁTICA E RENAL DE RATOS TREINADOS.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	39

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1: Estrutura química do estanozolol. Fonte: CUNHA, 2004..... 19

### Capítulo 2

Figura 1- A: desenvolvimento ponderal dos animais (g) ao longo do estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI) média  $\pm$  desvio padrão; B: ingestão sólida, em 24 horas, expresso em (g) durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI)..... 43

Figura 2-A: ingestão líquida em 24 horas dos ratos durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual e volume urinário ao longo do estudo de gaiola metabólica individual (GMI); B: volume urinário dos ratos durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI) expressa em mL..... 44

Figura 3: Rins dos animais dos grupos GC (A-B) e GCE (C-D). A - notar glomérulos normal (Gn), atrofiado (Ga) e o túbulo contorcido proximal com presença de alguns vacúolos (setas longas). B - congestão discreta na região medular (ponta de setas). C - congestão glomerular (setas curtas) e túbulos renais com presença de material eosinofílico intra luminal (asteriscos). D - congestão na região medular (ponta de setas). Barras 50 $\mu$ m. H.E..... 45

Figura 4: Rins dos animais dos grupos GT (A-B) e GTE (C-D). A - notar glomérulos atrofiados (Ga) e o túbulo contorcido proximal com presença de material eosinófilo no seu lúmen (setas longas). B - congestão na região medular (ponta de setas). C - degeneração dos glomérulos (Gd) e túbulos renais com morfologia alterada (asteriscos). D - degeneração dos túbulos coletores (ponta de setas). Barras 50 $\mu$ m. H.E..... 46

Figura 5: Imunohistoquímica para o VEGF-A nos rins dos animais. Controle: A (região cortical) e B (região medular), observar marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Exercício: C (região cortical) e D (região medular), observar também marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Glomérulos renais (setas) e Túbulos coletores (Tc)..... 47

Figura 6: Imunohistoquímica para o VEGF-A nos rins. Anabolizante: A (região cortical) e B (região medular) e GTE: C (região cortical) e D (região medular), observar fraca de marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Glomérulos renais (setas) e Túbulos coletores (Tc).....	48
Figura 7: Quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos controle e exercício e em relação aos outros. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).....	49
Figura 8: quantificação de glicogênio pelo método PAS.....	50
Figura 9: Fígado dos animais dos grupos GC (A), GCE (B), GT (C) e GTE (D). A - notar parênquima hepático com cordões de hepatócitos (setas longas), espaço porta (Ep) e sinusóides (setas curtas) bem preservados. B - Observar hepatócitos hipertróficos (setas longas) e redução do espaço do capilar sinusóide (setas curtas). C e D - congestão de veia hepática (asterisco), vacuolização dos hepatócitos (setas longas) e atrofia dos capilares sinusóides e). Barras 50µm. H.E.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise física, química e microscópica da urina (urinálise) realizada durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI) de 24 horas (n=5)..... 42

Tabela 2: <sup>1</sup>Média e desvio padrão dos hemogramas realizados com ratos tratados com estanozolol (n=5)..... 42

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida

AR- Receptor de andrógeno

CK- Creatinoquinase

DHT- Dihidrotestosterona

EAA- Esteroides anabólicos androgênicos

FDA- Food and Drug Administration

GMI- Gaiola metabólica individual

HPG- Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

IOC- Olímpico Internacional Committee

MP- Membrana plasmática

NTA- Necrose tubular aguda

ROS- Espécies reativas de oxigênio

ST- Estanozolol

TFN- Treinamento físico de natação

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, algumas das competições desportivas internacionais foram foco da atenção de escândalos mediáticos devido ao abuso de suplementos ergogênicos – substâncias usadas para melhorar o desempenho atlético, energia, aparência física ou a capacidade de trabalho – têm sido usados não apenas por atletas profissionais, mas também por amadores. No entanto, o termo doping refere-se apenas ao abuso destas substâncias no desporto de competição, ou seja, administração aos praticantes desportivos ou o uso por estes de classes farmacológicas de substâncias ou de métodos constantes das listas não aprovadas pelas organizações desportivas nacionais e internacionais (ROCHA, 2014). Os hormônios anabolizantes também conhecidos como esteroides anabólicos-androgênicos (EAA) tiveram um grande aumento em sua utilização por parte dos frequentadores de academias, utilizando-os para fins inapropriados (COSTILL & WILMORE (2002) apud WERNECK (2005), ou seja, utilização para uma obtenção de um melhor desempenho e por consequência uma melhora estética. As pessoas envolvidas em programas de exercícios com pesos desejam modificações estéticas, principalmente no que diz respeito ao emagrecimento e ao aumento da massa muscular. Concomitantemente, observa-se o uso crescente e indiscriminado de suplementos alimentares (SAs) e drogas com finalidades ergogênicas entre os praticantes de exercícios físicos (NOGUEIRA et al., 2015). O uso de EAA é uma forma única de abuso de drogas, que não é motivado por um efeito eufórico, mas sim os impulsos humanos para olhar melhor e alcançar uma vantagem competitiva. O uso de EAA envolve a ingestão ou injeção sintética de hormônios masculinos ou seus derivados para capitalizar sobre o papel do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) no estímulo crescimento e reparação do sistema musculoesquelético. A farmacologia de uso de EAA é bastante complexo, mas todos têm afinidade para o receptor de andrógeno (AR) e exercem a maioria de seu desejado efeitos através de mecanismos mediados por AR (HILDEBRANDT et al., 2014). Atualmente, mais de 60 tipos diferentes de EAA estão disponíveis para uso, com uma ampla variação na estrutura química (SILVA, 2010). A autoadministração de altas doses de EAA é muito difundida entre os jovens atletas com o objetivo de aperfeiçoar a força e ganhar massa muscular (MAIOR, 2010).

Os esteroides são derivados sintéticos dos hormônios andrógenos (testosterona) e estrógenos (estrogênio, estradiol e progesterona) que são oriundos do colesterol. Estes hormônios por sua vez, são responsáveis pelas características sexuais secundárias e maturação sexual, respectiva a cada sexo. Os EAA atuam principalmente na síntese proteica, agindo na célula da seguinte maneira: conseguem atravessar a membrana plasmática (MP) por possuírem um baixo peso molecular (SHUPNIK, 1997), após atravessar a MP se ligam a receptores citoplasmáticos formando um complexo denominado esteroide-receptor, este complexo por sua vez migra para o núcleo da célula e induz o DNA a sintetizar RNAm, que produzirá as proteínas (BAULIEU, 1975).

Os esteroides inicialmente eram utilizados com fins terapêuticos para tratar casos como anemia em pacientes com doenças crônicas nos rins, e também em processos de tratamento de quimioterapia, e em casos de desnutrição em longos tratamentos de corticoides (VELASCO & REVILLA, 2003). Foi utilizado também em casos de câncer de mama (CLARK, BLASBERG E BRANDLING-BENNETT, 1998). Outra indicação terapêutica clássica está associada a situações de hipogonadismo e situações de carência proteica provenientes de uma deficiência no metabolismo proteico (CUNHA, 2004). Os EAAs são responsáveis por um aumento da massa muscular, causando normalmente resultados rápidos nos usuários. Os anabolizantes muitas vezes são indicados ou receitados por profissionais mal preparados, instrutores e professores de educação física, com pouco conhecimento na área, que indicam e comercializam essas drogas, podendo ser adquiridas, em farmácias ou ilegalmente através de terceiros (RIBEIRO, 2001).

O estanozolol (ST) é um EAA, de caráter anabólico moderado, e androgênico baixo. De acordo com Roberts (2006) o ST é derivado de base estrutural da dihidrotestosterona (DHT). Segundo Velasco & Revilla (2003) o ST possui propriedades anticoagulantes, sendo útil no tratamento da anemia, desnutrição, no tratamento prolongado de corticoides, também em casos de câncer de mama, assim como no tratamento da quimioterapia.

Pouco se sabe a respeito dos efeitos deletérios nos rins e fígado causados devido ao uso de ST. Boada (1999) observou que ratos submetidos a tratamento com altas doses de ST demonstraram inflamação e degeneração do lobo central do fígado. Bispo (2009) relatou um caso onde um usuário de ST associado à oximetolona e metandrostenolona apresentou um quadro de insuficiência renal e hepática graves com

subsequente cardiomiopatia, vindo a falecer posteriormente em razão dos problemas hepáticos. Porém, não se pode afirmar que estes efeitos deletérios foram causados pelo uso de ST especificamente, visto que a pesquisa utilizou o ST associado a outros esteroides.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. ESTEROIDES ANABÓLICO-ANDROGÊNICOS: RELATO GERAL**

Os esteroides anabólico-androgênicos (EAA) são grupos de compostos naturais e sintéticos formados pela testosterona e seus derivados. A testosterona é sintética desde 1935 e durante a 2ª Grande Guerra foi utilizada pelas tropas alemãs para aumentar a agressividade dos soldados. Seu uso terapêutico até esta época restringia-se ao tratamento de pacientes queimados, deprimidos ou em recuperação de grandes cirurgias. Nos anos 50, foi utilizada sob forma oral e injetável no tratamento de alguns tipos de anemia, em doenças com perda muscular, bem como em pacientes pós-cirúrgico para diminuir a atrofia muscular secundária (LISE, 1999). Os EAA são substâncias indiscriminadamente usados por adolescentes e adultos, atletas e não-atletas, envolvendo múltiplos esteroides e doses supra fisiológicas. Uso não-médico supra fisiológico de EAA pode ser acompanhado pelo consumo de outras drogas, como o álcool, tabaco ou maconha. A aplicação clínica dos EAA é recomendada para a substituição hormonal da menopausa e no tratamento de caquexia (perda de massa corpórea) associada com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), insuficiência hepática ou renal, câncer e queimaduras graves (CAMARGO, 2014). Usado em tratamento de hipogonadismo, síndrome da falência da medula óssea, mineralização óssea e desordens da perda muscular. No Brasil, estudos quantitativos realizados em academias de musculação de São Paulo, Porto Alegre e Goiânia encontraram altas prevalências do uso de anabolizantes (respectivamente, 19%; 11,1% e 9%), alertando para o problema. Os mais utilizados são: testosterona, nandrolona, estradiol, estanozolol, metandrostenolona, cipionato de testosterona, metenolona e oximetolona (LUCHI, 2015).

A estrutura e a função hepática são severamente alteradas por altas doses de EAA. Os níveis séricos das enzimas hepáticas aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase e lactato desidrogenase são aumentados, e as desordens mais graves, podem ser induzidas por alta administração de EAA, como peliose hepática, hiperplasia hepatocelular e adenoma hepatocelular. No coração o abuso de EAA aumenta riscos de doenças cardiovasculares, aumento do colesterol total e baixa densidade nos níveis de proteínas, aumenta a pressão sanguínea, trombose e infarto do miocárdio. O rim também é afetado: creatinina, nitrogênio e ácido úrico são aumentados no abuso de

EAA. Além disso, os utilizadores de EAA têm um elevado risco de desenvolvimento de tumor de Wilm, o que não é de outro modo comum em adultos (FRANKENFELD, 2014).

Os EAA podem ser administrados oralmente, por injeção intramuscular e por via transdérmica. Andrógenos atuam ligando-se ao receptor de androgênio nuclear (AR) e no citoplasma em seguida, transloca-se para o núcleo. Esta ligação provoca alterações conformacionais sequenciais do receptor, afetam a interação entre o receptor e proteína e do receptor e DNA (BUSARDÒ, 2015).

EAA estimulam a síntese proteica, o que resulta em uma aceleração da taxa de conversão alimentar e aumento no crescimento muscular, massa corporal e desempenho aprimorado. Eles são também largamente consumidos em dopagem, tanto em animais quanto em humanos. Isto levou à proibição das drogas pela Olímpico Internacional Committee (IOC) em 1974 (POELMANS, 2002). Os efeitos dos EAA sobre o comportamento dos usuários têm sido há muito tempo pesquisados. Estudos relacionaram o mau uso dessas drogas a mudanças súbitas de temperamento e a síndromes comportamentais dentro e fora dos esportes. Middleman *et al.* 1995, apontam os EAA como importantes agentes causadores da síndrome comportamental de risco nos adolescentes. E em outro estudo, foi visto uma crescente literatura documentando casos de comportamento agressivo ou violento associado com o uso de EAA. Por exemplo, vários relatórios descreveram homens com pouca ou nenhuma história aparente de violência ou comportamento criminoso antes do uso do EAA que cometeu assassinato ou tentativa de assassinato ao usar EAA (KANAYAMA, 2010). Dentre os efeitos negativos do abuso de EAA estão irritabilidade, raiva e hostilidade, e sintomas cognitivos como distração, esquecimento e confusão (SILVA, 2002). Além disso, ST e outros são usados na prática como adjunto terapia para uma variedade de condições médicas, por exemplo, para estimular eritropoiese em alguns anemia e no tratamento de hipogonadismo masculino (BEUTEL, 2005). São utilizados no tratamento da anemia por falência de medula óssea, mielofibrose, insuficiência renal e anemia aplástica. Os EAA também são úteis no tratamento de certos cânceres como o de mama, em mulheres, e em outras condições ginecológicas como a endometriose e no tratamento da osteoporose (LISE, 1999). Terapia EAA está associada com vários efeitos adversos que são geralmente relacionadas à dose; portanto, o uso ilícito de altas doses tomadas por esportistas traz riscos substanciais para saúde (PEY, 2003).

De acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*), há indicação da administração dos EAA no tratamento de hipogonadismo nos homens, para aumentar a concentração de testosterona e derivados essenciais ao desenvolvimento, e manutenção de características sexuais masculinas. No tratamento da anemia, por falência da medula óssea, mielofibrose ou doença renal crônica, também há indicação de utilização dos EAA, por estimularem a síntese de epoetina e a eritropoiese e no tratamento da insuficiência renal aguda, por causarem diminuição na produção de ureia, com consequente redução do número de diálises necessárias. Além destas aplicações, há associação dos EAA ao tratamento da osteoporose por estimularem os osteoblastos, células responsáveis pela deposição de tecido ósseo e por diminuírem a dor óssea. A sua administração em pacientes com AIDS também tem mostrado efeitos satisfatórios assim como no tratamento de certos tipos de neoplasias, pois auxiliam no restabelecimento do peso corporal (CUNHA, 2004).

## **2.2. USO DE EAA E ASSOCIAÇÃO COM EFEITOS ADVERSOS**

A administração exógena de EAA tem demonstrado ter efeitos profundos sobre a próstata humana, incluindo aumento no seu volume, redução da taxa de fluxo de urina e alteração na micção (VARGAS et al., 2013). Alterações testiculares resultantes do uso de EAA são bem documentadas na literatura: altas doses de Decanoato de Nandrolona reduzem o volume dos testículos e o comprimento dos túbulos seminíferos em ratos (MUTALIP et al., 2013).

EAA estimulam a síntese proteica, resultando em uma aceleração da taxa de conversão alimentar e aumenta o crescimento muscular, massa corporal e aprimorada desempenho. Os androgênios podem ser utilizados como agentes terapêuticos, porque eles aceleram a recuperação de proteínas, deficiência e distúrbios com eliminação proteica (por exemplo, osteoporose), mas eles também são amplamente abusados em dopagem (POELMANS et al., 2002).

O uso de EAA tem sido o foco de investigação mundialmente, uma vez que a administração de EAA é frequentemente associada com vários efeitos adversos relacionados com a dose, o mais comum dos quais são: masculinizações mulheres e crianças, hipertensão, aterosclerose, trombose, icterícia, câncer, lesão do tendão, bem como desordens psiquiátricas e comportamentais em ambos os sexos (SILVA, 2010). Efeitos adversos adicionais associados com EAA incluem alterações nos níveis de

lipídios no sangue (aumento nos níveis de LDL e diminuição do HDL), várias formas de hepatotoxicidade, e distúrbios neuropsiquiátricos (HERLITZ, 2010).

Vários distúrbios do fígado têm sido relatados para ser associado com o consumo de EAA, ou seja, colestase, peliose, e tumores no fígado. Embora a maioria destes tumores sejam benignos, a detecção mais cedo é importante, a fim de evitar o riscos associados de hemorragias fatais e degeneração (SOCAS, 2005). Os aumentos nos níveis de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase) também são comuns em que os atletas usam esteroides. No entanto, estas enzimas podem muitas vezes ser elevados em levantadores de peso que não estão usando esteroides. A disfunção hepática é mais comumente associado com os esteroides 17-alfa alquilados. Tumores hepáticos, ambos benignos e malignos, foram ligados a administração de esteroides (MARAVELIAS, 2009). O uso abusivo de EAA causa diversos efeitos deletérios para o organismo, com consequências adversas de ordem metabólica, endócrina, cardiovascular, hepática, neural, estética, comportamental e psiquiátrica (SOZI, 2009).

### **2.3. IMPACTO DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS SOBRE ADOLESCENTES**

O uso de EAA tem aumentado dramaticamente nos últimos anos, particularmente entre adolescentes do sexo masculino. Milhões de adolescentes atualmente usam ou abusam de qualquer EAA. EAA estão agora sendo usados por adolescentes para uma série de razões que inclui ganho de massa corporal e força para aumentar a sua vantagem competitiva em esportes interescolares, bem como melhorar a aparência e autoestima. Um dos efeitos colaterais mais comumente reportados do uso de EAA em homens adultos é aumento da agressão. Uso de EAA, também tem sido associada a violência e agressão contra as mulheres (CHOI, 1994). Um relatório recente baseado em dados do estudo nacional longitudinal de saúde do adolescente examinou a relação entre o uso de EAA e violência em uma grande população de homens jovens. Os resultados destes estudos sugerem que jovens do sexo masculino que usavam EAA eram mais propensos a se envolver em violentos atos do que foram aqueles que não usavam EAA (LUMIA, 2010).

A prevalência de uso de esteroides entre adolescentes aumentou na década de 1990, causando preocupação entre profissionais da saúde. No entanto, a pesquisa não

tem mostrado consistentemente que esse aumento continuou no século seguinte. Por exemplo, o monitoramento do estudo futuro encontrou aumentos acentuados em uso de esteroides em 1999-2000, especialmente entre os meninos (BERG, 2007).

A exposição a concentrações elevadas de andrógenos durante a adolescência tem sido particularmente preocupante porque a puberdade é um período de maturação do cérebro sensível a hormônio e quando padrões de comportamento adulto são desenvolvidos. O aumento da testosterona na puberdade induz o aparecimento de mudanças externas distintas (características sexuais secundárias) e as alterações fisiológicas, como a espermatogênese. É também responsável pelo desenvolvimento de padrões normais e funcionais de comportamentos psicossociais como comportamentos sexuais e dominância social (McGINNIS, 2004).

#### 2.4. ESTANOZOLOL: ESTRUTURA QUÍMICA E AÇÃO

Estanozolol (ST) é um derivado sintético 17 $\alpha$ -alquilados de testosterona que exibe uma maior potência anabólica e uma degradação hepática mais lenta do que o hormônio masculino natural. ST e outros EAA são usados como terapias adjuvantes para uma variedade de condições médicas, por exemplo, para estimular a eritropoiese em pacientes com algumas condições de anemia, e atletas ou mesmo indivíduos sedentários podem usar EAA afimde melhorar o desempenho físico ou aparência (BOCALINI, 2014). Um dos EAA mais comumente usados é o ST. Sua estrutura química é explorada na figura 1.

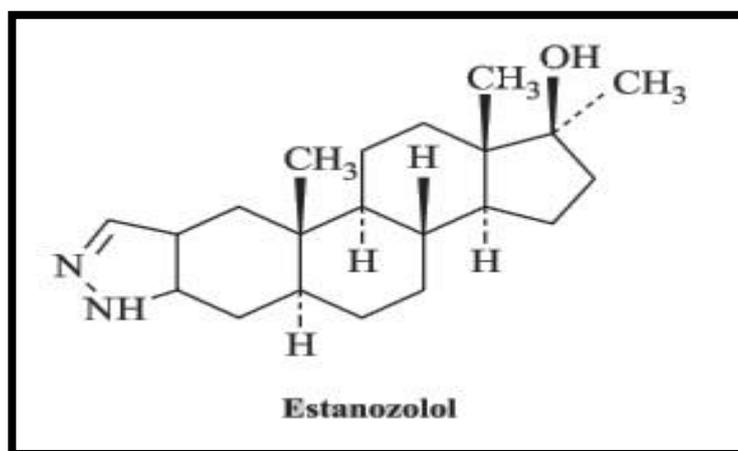


Figura 1. Estrutura química do Estanozolol. Fonte: CUNHA, 2004.

A administração prolongada de ST provoca disfunção da cadeia respiratória mitocondrial mais precisamente na catalisada pelo citocromo P450 que é a monooxigenase, sendo possível que estas alterações sejam acompanhadas por um aumento da geração das espécie reativas de oxigênio (ROS). Embora fígado seja dotado com elevados níveis de defesas a antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, no aumento na produção de ROS superior a defesas antioxidantes e capacidade de reparação pode levar ao estresse oxidativo e danos celulares. Este tipo de risco deve ser maior se o consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) for aumentado como ocorre durante o exercício (PEY, 2003).

## **2.5. USO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS E FUNÇÃO RENAL**

A avaliação da função renal é um dos mais antigos desafios da medicina laboratorial. Muitos avanços foram feitos nesse campo desde a primeira dosagem de creatinina feita por Jaffe, em 1886. Porém, ainda há espaço para o desenvolvimento de marcadores laboratoriais da função renal. É mais fácil compreender a avidez por esses marcadores quando se analisa o impacto da doença renal (SODRÉ, 2007). Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano. Assim, não é surpresa constatarmos que, a diminuição progressiva da função renal, implique em comprometimento de essencialmente todos os outros órgãos (BASTOS, 2010).

Há múltiplas patologias renais relacionadas com o uso indiscriminado destas substâncias, nomeadamente: litíase renal, necrose tubular aguda, proteinúria, glomeruloesclerose focal segmentar, carcinoma das células renais e tumor de Wilms. No entanto, muitos destes indivíduos têm fatores nefrotóxicos adjuvantes como o consumo de anti-inflamatórios não esteroides, suplementos nutricionais, dietas hiperproteicas e desidratação. Como exemplo, os halterofilistas apresentam facilmente rhabdomiólise com elevações dos níveis séricos da creatinoquinase (CK), levando a mioglobulinemia, mioglobulinúria, aumento da creatinina e conseqüentemente diminuição da taxa de filtração glomerular e progressão ocasional para insuficiência renal aguda (ROCHA, 2014).

Tendo em vista a existência de poucos estudos acerca da verificação e efeitos dos EAA em especial o ST em rins e fígado, faz-se necessário avaliar possíveis

modificações morfofisiológicas sobre rins e fígado de ratos *wistar* e sua influência a respeito dos efeitos deletérios.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, M.G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G.M.; Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev Assoc Med Bras**, 2010; 56(2): 248-53.
- BAULIEU, E. E. Some aspects of the mechanism of action of steroid hormones. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 7, n. 3, p. 157-174, 1975.
- BEUTEL, A. et al.; Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and Reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** 93 (2005) 43–48.
- BERG, P.V.D. et al; Steroid Use Among Adolescents: Longitudinal Findings From Project EAT. **PEDIATRICS** Volume 119, Number 3, March 2007.
- BISPO, M. et al. Anabolic steroid-induced cardiomyopathy underlying acute liver failure in young bodybuilder. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, p. 2920-2922, 2009.
- BOADA, L.D. et al. Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. **Arch. Toxicol.**, v.73, n.8-9, p.465-472, 1999.
- BOCALINI, D.S. et al; Treadmill Exercise Training Prevents Myocardial Mechanical Dysfunction Induced by Androgenic- Anabolic Steroid Treatment in Rats. **PLoS ONE** 9(2): e87106. doi:10.1371/journal.pone.0087106, 2014.
- CHOI, P.Y.; POPE, H.G.; Violence toward women and elicit androgenic–anabolic steroid use. **Ann Clin Psychiatry** 1994; 6:21–5.
- CLARK, A.S. et al. Stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiology & behavior**, Hanover, n. , p.287-295, 25 jul. 1998.
- CUNHA, T.S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.
- FRANKENFELD, S.P. et al; The Anabolic Androgenic Steroid Nandrolone Decanoate Disrupts Redox Homeostasis in Liver, Heart and Kidney of Male Wistar Rats. **PLoS ONE** 9(9): e102699. doi:10.1371/journal.pone.0102699, 2014.
- HERLITZ, L.C.; MARKOWITZ, G.S.; Development of Focal Segmental Glomerulosclerosis after Anabolic Steroid Abuse. **J Am Soc Nephrol** 21: 163–172, 2010.
- HILDEBRANDT et al.; Exercise reinforcement, stress, and -endorphins: An initial examination of exercise in anabolic–androgenic steroid dependence. **Drug and Alcohol Dependence** 139 (2014) 86–92

- JAFFE, M. Z. Methods determining creatinine. **Physiol Chem**, v. 10, p. 39-40, 1886.
- KANAYAMA, G. et al; Ilicit anabolic–androgenic steroid use. **Hormones and Behavior** 58 (2010) 111–121.
- LISE, M.L.Z. et al; O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Rev Ass Med Brasil**, 1999; 45(4): 364-70
- LUCHI, W.M. et al; Nefrocalcinose associada ao uso de esteroide anabolizante. **J Bras Nefrol** 2015; 37(1):135-140.
- LUMIA, A.R.; MCGINNIS, M.Y.; Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. **Physiology & Behavior** 100 (2010) 199–204.
- MAIOR, A.S. et al; Abnormal cardiac repolarization in anabolic androgenic steroids users carrying out submaximal exercise testing. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2010. (37, 1 129–1133).
- MARAVELIAS, C.; STEFANIDOU, A.D.M.; SPILIOPOULOU, C.; Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. **Toxicology Letters** 158 (2005) 167–175.
- MCGINNIS, M.Y.; Anabolic Androgenic Steroids and aggression studies using animal models. **New York Academy of Sciences**, 2004.
- MUTALIP, S.S.N. et al.; Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol. **Iran J Reprod Med** Vol. 11. No. 8. pp: 653-658, August 2013.
- NOGUEIRA, F.R.S. et al.; Prevalência de uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. **Rev Bras Ciênc Esporte**. 2015;37(1):56-64.
- PEY, A. et al.; Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 87 (2003) 269–277.
- POELMANS, S. et al.; Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. **Analytica Chimica Acta** 473 (2002) 39–47.
- RIBEIRO, P.C.P. O uso indevido de substâncias: esteroides anabolizantes e energéticos. **Adolesc. Latino am.**, mar., vol.2, no.2, p.97-101. ISSN 1414-7130, 2001.
- ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H.; O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos – uma epidemia silenciosa. **Rev Port Endocrinol Diabetes Metab**. 2014; 9(2): 98–105.
- SHUPNIK, M. A.; SCHREIHOFER, D. A.; Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 341-344, 1997.

SILVA, M.T.B. et al.; Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 46, n. 1, jan./mar., 2010.

SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R., CZEPIELEWSKI, M.A.; Esteróides anabolizantes no esporte. **Rev Bras Med Esporte** \_ Vol. 8, Nº 6 – Nov/Dez, 2002.

SOCI, U.P.R. et al.; Esteróide anabolizante inibe a angiogênese induzida pelo treinamento físico de natação em músculo sóleo de ratos normotensos. **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte**, São Paulo, v.23, n.3, p.195-209, jul./set. 2009.

SODRE, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C.; Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. 2007, vol.43, n.5, pp. 329-337. ISSN 1678-4774.

VARGAS, R.A. et al.; The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats. **Int Braz J Urol**, 2013; 39: 675-82.

VELASCO, A. M. I.; REVILLA, J. A. M. G. Método de Preparación en fase sólida para la detección de bajas concentraciones de metabolitos de estanozolol en muestras de orina. **Laboratório de Control de Dopaje**. 5: 28040, 2003.

WILMORE, J.H., COSTILL, D.L.; **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 2ª Ed. São Paulo: Manole, 2001.

## CAPÍTULO II

### AÇÃO DO ESTANOZOLOL SOBRE AS FUNÇÕES MORFOLÓGICAS RENAIIS E HEPÁTICAS DE RATOS TREINADOS COM NATAÇÃO

*[STANOZOLOL ACTION ON THE FUNCTIONS AND MORPHOLOGICAL RENAL  
LIVER OF RATS TRAINED WITH SWIMMING]*

F.C.S de Lima<sup>a</sup>; A. A. C. Teixeira<sup>b</sup>, S.B.da Silva<sup>c</sup>; W.E. da Silva<sup>c</sup>; I.M.F. de Melo<sup>c</sup>;  
A.F. Soares<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, nível de mestrado, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – DMFA/UFRPE, Brasil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – DMFA/UFRPE, Brasil.

\***Autor para correspondência:** DMFA/UFRPE, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – Recife/PE, CEP 52171-900. Tel.: 55(81)3320.6394 e-mail: [anisiofsoares@gmail.com](mailto:anisiofsoares@gmail.com)

## RESUMO

Alterações renais e hepáticas relacionadas com a utilização de EAA em doses supra fisiológicas ainda não são bem descritos. No presente estudo foi analisado os efeitos deletérios renais e hepáticos de ratos *wistar* tratados com Estanozolol (ST). Foram utilizados 32 ratos *wistar* machos, jovens divididos em quatro grupos: **GC** (Grupo controle); **GCE** (Grupo controle-exercício); **GT** (Grupo tratamento-esteróide); **GTE** (Grupo tratamento-esteróide-exercício). Os animais dos grupos GT e GTE (n=16) foram submetidos a injeções subcutâneas, 5 (cinco) dias/semana, durante 30 dias, na concentração de 5mg/kg de estanozolol diluído em 1 mL/kg de óleo de gergelim, que foi utilizado como veículo. A natação foi definida como exercício físico. Os achados deste projeto indicam aumento no desenvolvimento ponderal de animais submetidos ao Estanozolol e exercício a partir da 3ª semana de uso e também aumento na excreção urinária a partir da 5ª semana de uso nos animais submetidos as mesmas condições; denotam ampla ação do Estanozolol nos grupos tratados, notadamente, os rins dos animais dos grupos GCE com visível congestão glomerular, túbulos renais com presença de material eosinofílico intraluminal e congestão na região medular, já os animais do grupo GT nota-se glomérulos atrofiados e o túbulo contorcido proximal com presença de material eosinófilo; é observado ainda, no grupo GTE que há degeneração dos glomérulos, túbulos renais com morfologia alterada e degeneração dos túbulos coletores. No fígado dos animais, do grupo GCE foi observado hepatócitos hipertróficos e redução do espaço do capilar sinusóides, enquanto nos animais dos grupos GT e GTE foi registrado congestão da veia hepática, vacuolização dos hepatócitos e atrofia dos capilares sinusóides. Enfim, a administração de ST na dose de 5,0 mg / kg causou alterações renais e hepáticas em ratos *Wistar*, sugerindo que o ST contribui com efeitos adversos ao organismo de seus consumidores pelo uso indevido.

**Palavras-chave:** anabolizantes, estanozolol, função renal, hepatotoxicidade.

## **ABSTRACT**

Kidney and liver changes related to the use of AAS in physiological doses above are not well described. The present study examined the kidney and liver deleterious effects of Wistar rats treated with Stanozolol (ST). 32 male Wistar rats were used, young people divided into four groups: control group (control group); GCE (Control group-exercise); GT (Group-steroid treatment); GTE (Group treatment-steroid-exercise). The animals GT and GTE groups (n = 16) underwent subcutaneous injections, five (5) days / week for 30 days, at a concentration of 5mg / kg stanozolol diluted in 1 ml / kg of sesame oil, which it was used as vehicle. Swimming was defined as exercise. The findings of this project indicate increase in the weight development of the animals submitted to Stanozolol and exercise from the 3rd week of use and also an increase in urinary excretion from the 5th week of use in animals undergoing the same conditions; denote wide action Stanozolol in the treated groups, notably the kidneys of animals GCE groups with visible glomerular congestion, renal tubules with presence of intraluminal eosinophilic material and congestion in the spinal region, since the animals in the group GT is noted glomeruli atrophy and proximal convoluted tubule with presence of eosinophils materials; It is still observed in the GTE group that there is degeneration of the glomeruli, renal tubules with altered morphology and degeneration of the collecting tubules. In the liver of animals, the GCE group was observed hypertrophic hepatocytes and reduced space sinusoidal capillary, while the animal GT and GTE groups was recorded congestion of the hepatic vein, vacuolation of hepatocytes and sinusoidal capillaries atrophy. Anyway, ST administration at a dose of 5.0 mg / kg caused kidney and liver changes in rats, suggesting that ST contributes to adverse effects to the body of their customers by misuse.

**Keywords:** anabolic steroids, stanozolol, renal function, liver toxicity

## INTRODUÇÃO

Esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona (BAHRKE, 2004). EAA são utilizados na medicina há pelo menos cinco décadas e sua indicação terapêutica está associada a quadros de hipogonadismo e deficiência do metabolismo proteico. Além disso, são amplamente utilizados no meio desportivo com o objetivo de melhorar o desempenho atlético. Assim como os endógenos, também possuem tanto atividade anabólica como androgênica, sendo que a relação anabólica/androgênica varia de acordo com o tipo de substância utilizada (CUNHA, 2004). A testosterona e os seus análogos sintéticos têm sido usados para aumentar a massa muscular esquelética e melhorar o desempenho físico. Além disso, é bem descrito que os EAA tem ações cardiovasculares e que o coração é um órgão alvo dos EAA.

EAA são usados por atleta e não atletas para melhorar o desempenho aumentando o desenvolvimento muscular e força. A literatura retrata que seu uso começou em 1950, com exercício muscular de atletas e fisiculturistas. Desde então, propriedades estrutural e farmacocinéticas foram revistos extensivamente. O mecanismo de ação de todo EAA é semelhante para todos os outros hormônios esteroides em que eles se ligam, em tecidos-alvos, a uma proteína intracelular, conhecido como o receptor de androgênio, para formar um complexo de receptores de androgênio no núcleo da célula (D'ERRICO, 2011).

Um dos EAA mais populares é o Estanozolol (ST), um derivado androgênico  $17\alpha$ -alquilado, que apresenta uma maior potência anabólica e degradação hepática mais lento do que o hormônio natural masculino (BOCALINE et al., 2014). Os esteroides anabólicos são comumente utilizados em terapias em humanos e animais pois melhoram a síntese de proteínas e crescimento de massa. No entanto, o uso indevido de esteroides anabolizantes na década passada conduziu à detecção frequente destes compostos em análises de dopagem. O ST é permitido para uso zootécnico, no entanto é proibido para fins de engorda para os animais, destinados para consumo humano. Devido à rápida metabolização de ST, o abuso pode ser detectado principalmente através dos seus hidroximetabólitos (TÖLGYESI, 2014).

Como a maioria dos outros esteroides anabolizantes, o ST tem um comportamento de cromatografia gasosa pobre e difíceis de detectar na urina, devido a depuração renal e excreção urinária baixa. Isto é devido à rápida metabolização, levando

a uma baixa concentração nos níveis do composto original encontrado na urina (POELMANS, 2002).

Alterações renais relacionadas com a utilização de EAA em doses suprafisiológicas ainda não são bem descritas. Embora os efeitos potenciais do EAA sobre função renal não tenham sido bem caracterizados em humanos, vários estudos sugerem que os androgênios possam exercer um efeito tóxico direto sobre as células glomerulares, levando ao acúmulo na matriz mesangial e esgotamento do podócito independente de adaptações estruturais funcionais (D'ERRICO, 2011). Entre os muitos efeitos adversos causados por EAA prejudiciais ao fígado estão a peliose hepática, icterícia colestática, e adenomas hepatocelulares têm sido associados com o abuso de drogas anabolizantes (WELDER, 1995).

Tendo em vista a existência de poucos estudos acerca da verificação e efeitos dos EAA em especial o ST em rins e fígado, este trabalho teve por objetivo avaliar possíveis modificações morfofisiológicas sobre rins e fígado de ratos *wistar*. Estes animais se apresentam como modelos para estudos pós tratamento com doses supra fisiológicas do ST. Assim, visou-se analisar os impactos causados pelo mesmo, avaliando-se seu papel na função renal, balanço hídrico, desenvolvimento ponderal e aspectos histológicos renais e hepáticos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **ANIMAIS**

Neste estudo, foram utilizados 32 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) de 60 dias, adultos jovens com peso entre 230±19 g, provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que foram acondicionados em caixas coletiva e mantidos em ambiente com temperatura de 22±5 °C com ciclos alternados de claro-escuro de 12 horas, em regime de alimentação *ad libitum*. Todas as metodologias e procedimentos com animais realizados neste estudo foram previamente submetidas e aprovadas pelo comitê de ética no uso de animais da UFRPE (Processo nº. 23082.004328/2014-UFRPE) e licença nº 074/2014 respectivamente.

## **FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO**

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos contendo 8 animais cada, sendo assim denominados: **GC** (Grupo controle - Animais não submetidos a exercício e não tratados com esteroide); **GCE** (Grupo controle-exercício - Animais submetidos a exercício, mas não tratados com esteroide); **GT** (Grupo tratamento-esteroide - Animais não submetidos ao exercício, mas tratados com esteroide); **GTE** (Grupo tratamento-esteroide-exercício - Animais submetidos ao exercício e tratados com esteroide). Os animais dos grupos GT e GTE (n=16) foram submetidos a injeções subcutâneas, 5 dias/semana, durante 30 dias, na concentração de 5mg/kg de estanozolol diluído em 1 mL/kg de óleo de gergelim, que foi utilizado como veículo; doses baseadas no modelo de dependência descrito por Breuer et al 2001. Os animais dos grupos GC e GCE foram submetidos as mesmas condições de administração dos grupos GT e GTE, exceto pela ausência do esteroide no veículo que foi administrado.

## **EXERCÍCIO FÍSICO**

A natação foi definida como exercício físico, tendo em vista que a literatura relata que o exercício de força pode causar ferimentos aos membros e patas dos animais, por conta do impacto causado no desempenho dos modelos deste tipo de exercício, além do estresse decorrente dos mesmos, o que pode comprometer a qualidade dos resultados (PERES; LUCIANO, 1995).

Uma semana antes do início do tratamento os animais foram submetidos a um período de adaptação a natação, que consiste no modelo a seguir: 5 minutos de atividade no primeiro e segundo dia, 10 minutos no quarto e quinto dia, 15 minutos nos dois posteriores, e 20 minutos no sétimo dia. Depois deste período de adaptação, os animais foram submetidos a 20 minutos de atividade por dia, consistindo 5 vezes por semana, durante 4 semanas.

## **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO PONDERAL**

O peso dos animais dos quatro grupos foi mensurado semanalmente a partir do início do tratamento com o esteroide, para acompanhamento e avaliação do desenvolvimento ponderal.

## **ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL E DO BALANÇO HIDRICO**

Para contribuir nos estudos de função renal e do balanço hídrico foram utilizadas gaiolas metabólicas individuais (GMI) Tecniplast® semanalmente por um período de 24 horas, ratos foram retirados de suas gaiolas coletivas e colocados nas GMI. A água e a ração foram mensurados separadamente antes e após as 24 horas e a urina coletada continuamente, tendo seu volume mensurado e cada amostra acondicionada em tubos e congelada a  $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. A partir destes dados o estudo do balanço hidroeletrólítico foi realizado.

- a) A ingestão sólida (IS, em g/100g/24h), determinada por método gravimétrico em balança mecânica, onde foi pesada a ração de cada animal e após as 24 horas, obtendo-se assim o total consumido em 24 horas;
- b) A ingestão líquida (IL, em mL/100g/24h), determinada por método volumétrico, em vidraria de precisão, sendo medido o volume de água no início e ao fim das 24 horas, para cada animal;
- c) A diurese (Volume Urinário, em mL/100g/24h) coletada continuamente, sendo seu volume determinado por método volumétrico;
- d) A densidade urinária de 24h (D, em g/l), medida em refratômetro;
- e) O pH da urina, determinado em pHmetro;

## **ESTUDO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS RENAI E HEPATICOS**

Para este protocolo, após as quatro semanas de experimento, 5 animais de cada grupo GC, GCE, GT e GTE foram submetidos a eutanásia (sendo um animal de cada grupo eutanasiado por semana), para isso, os animais foram anestesiados por via intramuscular com quetamina (80mg/Kg) e xilazina (6mg/Kg) para a remoção total dos rins e fígado. Foi realizada a abertura da cavidade abdominal para a retirada dos órgãos

e assim que coletados foram posteriormente fixados em formol tamponado por um período de 24 horas e processados para inclusão em parafina para serem processados e realizados os estudos histológicos. Os rins foram submetidos a técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) e a técnica de Imunohistoquímica para estudo do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) nos rins. Os fígados dos animais foram submetidos a técnica de coloração hematoxilina-eosina (H.E.) e do Ácido Periódico de Schiff (PAS) para testes histoquímicos. A captura da imagem foi efetuada por meio da câmera de Vídeo Sony® Bx50.

O sangue dos animais foi coletado no 7º, 14º, 21º e 28 dia de experimento através da punção cardíaca com seringas contendo EDTA e colocados em eppendorf, após realizada a abertura da cavidade abdominal.

### **IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O VEGF NOS RINS**

Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos (potência 8). A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contra corados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de luminescência onde os tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255, representa o branco absoluto (maior luminescência) (OBERHOLZER et al., 1996).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos em médias aritméticas e respectivos desvios padrões. Foi empregado o *Statistical Program for Social Sciences* (SPSS), versão 11.0.1 para Windows, aplicados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **ANÁLISE FÍSICA, QUÍMICA E MICROSCÓPICA DA URINA (URINÁLISE) REALIZADA DURANTE O ESTUDO DA GAIOLA METABÓLICA INDIVIDUAL (GMI) DE 24 HORAS.**

Na Tab. 1 estão apresentados os resultados da análise física, química e microscópica da urina (urinálise) realizadas com material obtido durante os estudos com Gaiola Metabólica Individual (GMI) de 24 horas, feita nos diferentes grupos experimentais. Como podem ser observados, os resultados foi semelhante entre os grupos em todos os parâmetros analisados: cor, odor, aspecto, densidade, depósito, pH, Bilirrubina, corpos cetônicos, glicose, nitritos, sangue e urobilinogênio, à exceção da presença de proteínas que apresentaram uma leve tendência a redução no GTE respectivamente. Em relação ao desenvolvimento ponderal dos animais e sua ingestão sólida, na Fig. 1-A é observado um desenvolvimento ponderal esperado para a espécie proporcional a sua idade, sem apresentar diferenças entre os grupos nas semanas iniciais de acompanhamento; no entanto a partir da terceira semana de GMI os animais do GTE apresentaram seu desenvolvimento aumentado em relação aos demais grupos, e esta diferença se manteve na quarta e quinta semana de estudo nas GMI. Quando se observa a ingestão sólida (Fig. 1-B) os animais apresentaram um consumo semelhante entre os grupos durante todo o período de estudo. Os efeitos da administração de esteroides na massa corporal são conflitantes. Há estudos que mostram efeitos positivos, não há alterações ou mesmo uma redução da massa corporal em resposta a tratamento crônico com esteroides anabolizantes (BOCALINE et al., 2014), embora, por outro lado, Moirón et al. (2015) aborde que o músculo esquelético de rato em tratamento com ST

protege a mitocôndria contra danos oxidativo das proteínas e alterações na composição de ácidos graxos da membrana induzida pelo exercício agudo.

A Fig. 2-A apresenta valores de Ingestão líquida e volume urinário dos animais durante os estudos nas GMI, assim pode ser constatado que os animais apresentaram um padrão de consumo de água fornecida compatível com os padrões para a espécie em todo período estudado e por todos os grupos experimentais. O consumo de ração e ingestão hídrica para ratos são, respectivamente, de 5 g e 10 mL para cada 100 g de peso do animal/dia, existindo ainda forte correlação quanto mais alimento é consumido mais água é ingerida. Contudo, o consumo varia de acordo com a temperatura e umidade ambiental, estado de saúde, vida sexual e hora do dia, sendo que os ratos possuem hábitos noturnos e alimentam-se sempre à noite (CARVALHO et al., 2009). A Fig. 2-B apresenta a excreção urinária destes animais, onde, excetuando-se o GTE na 5ª semana de estudos em GMI que apresentou aumento no seu volume urinário, todos os demais grupos e em todas as semanas de estudos apresentaram volume urinário semelhante. A coleta de urina durante boa parte do experimento mostrou que a média do volume de urina dos ratos, seria concordante com valores descritos por Castro et al. (2014), que variam de 8 a 11 mL.

## **ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS**

Os parâmetros hematológicos podem ser observados que não houve alteração numérica nas hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nos grupos experimentais em relação ao seu controle. Houve uma diminuição dos leucócitos no GTE em relação aos grupos GT e GCE. As análises revelaram que com relação aos linfócitos houve um aumento no GT e uma diminuição no GTE, e em relação ao número de plaquetas, houve diminuição no GTE quando comparado ao GT e GCE. Quanto a número de proteínas totais, houve diminuição no grupo GTE em comparação aos outros grupos. De acordo com Cunha et al. (2004), alterações hematológicas, decorrentes do abuso de EAA, também podem ser observadas, como mudanças do tempo de coagulação. Os EAA estimulam a eritropoiese através do aumento da síntese de eritropoetina, podendo causar policitemia e aumento do hematócrito, o que pode favorecer a formação de trombos e aumentar os riscos de ocorrência de acidente vascular cerebral isquêmico. Injeções supra fisiológicas AAS tendem a provocar alterações no perfil das lipoproteínas

somente após sete semanas de administração (CUNHA et al., 2005). Sabe-se geralmente que o abuso de EAA leva a elevados níveis de hematócrito e hemoglobina como já foi demonstrado em fisiculturistas de acordo com Mullen et al., (2014), o que não foi o caso do nossos resultados.

### **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS RINS PELO MÉTODO HE**

Como demonstrado na Fig. 3 e 4 rins dos animais dos grupos GC (A-B) e GCE (C-D) e rins dos animais dos grupos GT (A-B) e GTE (C-D) respectivamente. No grupo GC há evidência de atrofia glomerular e em alguns glomérulos uma glomerulonefrite proliferativa. Alguns túbulos renais principalmente o túbulo contorcido proximal estão apresentando uma discreta hidropisia (degeneração hidrópica) com presença de alguns vacúolos e com presença de descamação de células e da porção apical onde tem microvilosidades. Pode-se ainda evidenciar material eosinofílico depositado no lúmen, no entanto os túbulos distais não apresentam estas alterações. As descamações quando registradas são vistas como material eosinofílico depositado no lúmen. Nesta figura ainda pode ser observada células com características sugestivas de Nefrose ou necrose de túbulos. Há congestão discreta, cortical e medular (mais evidente nesta). Observam-se principalmente nos túbulos renais relacionado com a alça de Henle porção espessa uma discreta vacuolização e redução do diâmetro do epitélio registrado na região cortical.

Nos animais do grupo GCE em relação ao controle apresenta uma maior glomerulonefrite proliferativa (lesão mais evidente). Os túbulos renais estão com presença de material eosinofílico intraluminal, e isto decorre de necrose tubular. Há uma hidropisia nos túbulos proximais e os túbulos distais estão começando a descamar. Existe congestão nos glomérulos. Há uma congestão córtico-medular (medular) onde se observa que além de hidropisia da alça de Henle porção descendente, observa-se o debris celular intraluminal e atrofia destes túbulos renais. Degeneração do glomérulo renal bem evidente com presença de albumina no espaço sub capsular relacionado a albuminúria, o que pode comprometer a função renal.

No grupo GT a atrofia glomerular é muito evidente. O espaço subcapsular no caso da capsula de Bowmann está bem evidente na maioria dos glomérulos, que estão congestos e apresentando glomerulonefrite proliferativa. A análise morfológica dos rins mostrou que o ST causa alterações renais, assim como dados vistos na literatura sobre o

primeiro caso com biópsia renal foi descrito em 1994 por Yoshida *et al.*, que mostraram a presença de necrose tubular aguda (NTA) em um homem de 26 anos com grave colestase após o uso de ST. As possíveis causas de insuficiência renal, neste caso, foram colestase e hiperbilirrubinemia induzida pela utilização de estanozolol. Como sugere Revai *et al.* (2000), neste nosso estudo o treinamento intenso combinado com EAA, como visto em levantadores de peso, pode causar danos nos rins.

No grupo GTE é observado que os túbulos renais não estão tão distensos, podendo-se ver o lúmen. Há vacuolização do glomérulo e material decorrente de debris celular. Alterações mais evidentes na região cortical. Na região medular há descamação da porção superficial com atrofia do epitélio da alça de Henle porção descendente, vacuolização e degeneração celular dos túbulos coletores. As associações dos EAA com glomerulopatias também são descritas. Estudo em modelo animal demonstrou o efeito da testosterona na apoptose de podócitos precedendo à formação de glomerulosclerose, segundo Doublier (2011). Adicionalmente, Deshmukh, *et al.* (2012) cita que dopagem com ST é suspeito se a concentração urinária de ST e / ou os seus metabolitos excede 2 ng / mL. O ST, juntamente com outros EAA, é assim chamado "fármaco de treino", que é levado para um prolongado período, tipicamente em ciclos, durante a preparação, a fim para obter os efeitos de melhoria de desempenho desejados. Além disso, urinálise também não consegue distinguir entre o uso crônico e exposição única, acidental de drogas.

### **ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O VEGF-A NOS RINS**

A análise imunohistoquímica do VEGF-A nos rins dos animais dos grupos controle e exercício, revelou forte marcação nas regiões cortical e medular, principalmente nos glomérulos renais e túbulos coletores, respectivamente (Fig. 5A-5D). Entretanto, os rins dos animais dos grupos GTE + GT apresentaram, fraca marcação para a expressão do VEGF-A (Ex.: Figura (6A-6D)). A quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A não revelou diferenças significativas dos pixels entre os rins dos animais dos grupos GC e GCE, porém os grupos GT e GTE apresentaram os maiores valores, diferindo significativamente dos grupos GC e GCE, no entanto, os mesmos não diferiram entre si (Ex.: Fig. 7). VEGF é considerado o principal fator de crescimento envolvido na angiogênese e sua expressão é iniciada pela hipóxia e fortemente estimulada pelo estresse de cisalhamento decorrente do aumento

do fluxo sanguíneo nas sessões de exercício durante o treinamento aeróbio. O estímulo físico do aumento de fluxo como ocorre, por exemplo, durante o exercício físico é capaz de disparar a biossíntese de fatores de crescimento angiogênicos protetores contra doenças vasculares (Prior, Yang & Terjung, 2004).

## **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO FÍGADO**

Para análise da quantificação de glicogênio no fígado, foi utilizada a técnica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) para este fim e expressa em pixels. Não foram observadas mudanças significativas com relação aos grupos, excetuando-se no grupo GCE que apresentou uma redução significativa como aborda a Fig. 8. O efeito da intensidade de treinamento para essa variável em específico parece ser mais fortemente associado ao fator intensidade de treino do que ao uso dos esteroides anabolizantes, sobretudo porque o grupo que fez uso da substância, na literatura, parece, comprovadamente, treinar de maneira mais intensa se comparado aos indivíduos que apenas treinam e não utilizam essas drogas de acordo com Hartgens (2004).

O fígado dos animais dos grupos GC, GCE, GT e GTE corados em H.E apresentados na Fig. 9, observa-se que o fígado dos animais do grupo GC (Fig. 9-A) apresentam cordões de hepatócitos no parênquima hepático, revelando também o espaço porta e sinusóides bem preservados. O fígado foi estimulado a processo proliferativo e não apresenta processos degenerativos como vacuolização ou necrose em larga escala no parênquima, o que faz este fígado estar dentro de uma normalidade.

No fígado dos animais do GCE (Fig. 9-B) há presença de hepatócitos hipertróficos e muitos com núcleos duplos; esta hiperplasia com hipertrofia está diminuindo o espaço do capilar sinusóides e necrose de coagulação difusa. Está presente ainda, uma maior proliferação de células de ducto no espaço porta, além de muitas células com núcleo binucleado e ductos se formando, o que faz esse fígado ter mais comprometimento. Como aborda Cruzat (2007), indivíduos que se submetem a exercícios intensos e prolongados ou treinos exaustivos, ou ainda, que possuem frequência de treinamento muito elevada podem suplantar a capacidade do sistema antioxidante endógeno e, em decorrência, promover graves lesões musculares, com conseqüente processo inflamatório local e estresse oxidativo.

No grupo GT Fig. 9-C há congestão de veia hepática, vacuolização moderada dos hepatócitos, necrose de coagulação moderado, porém difusa. Atrofia dos capilares sinusóides e proliferação dos ductos biliares também são observados. De acordo com Neri et al. (2011), estanozolol, e outros AAS ativos administrados por via oral, tem demonstrado causar lesões inflamatórias ou degenerativas, nos hepatócitos centrilobulares, alterações ultraestruturais no canalículos e alterações degenerativas em mitocôndrias e lisossomos. No fígado (HARDT et al. 2012), o consumo de EAA 17 $\alpha$ -alquilados induz colestase, peliose hepática e tumores no fígado.

O grupo GTE, Fig. 9-D apresentou as mesmas lesões do grupo GT. Como visto por Deshmukh, et al. (2012), que sugerem estudos futuros visando expandir o período de tratamento de 3 ou mais semanas de ST para imitar uso típico do atleta, em nosso estudo buscamos corroborar com o que foi visto, juntamente com a ideia de experimentação com condições e diferentes doses de ST. Estes métodos recentemente desenvolvidos podem ajudar *in vivo* estudos concebidos para investigar o metabolismo de ST. Há como derivados alquilados (compostos oralmente ativos), o danazol e estanozolol, sendo os mais hepatotóxicos (ROCHA et. al., 2014) e tumores hepáticos, ambos benignos e malignos, foram ligados à administração de esteroides (MARAVELIAS, 2005). Acerca do treinamento físico de natação ao quais os animais foram submetidos, ao uso de EAA como substâncias ergogênicos é geralmente acompanhada pelo exercício físico, sendo este conhecido por afetar um grande número de fatores fisiológicos e sistemas bioquímicos, era aconselhável para controlar a possível influência do treinamento físico sobre os efeitos do ST no fígado (KICMAN, 2008).

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a administração de Estanozolol na dose de 5,0 mg/kg em ratos Wistar causa alterações na morfologia renal e hepático, bem como na morfologia de ambos órgãos; caracterizando assim os efeitos deletérios do Estanozolol no modelo estudado. A literatura é divergente em relação aos efeitos adversos ao organismo dos consumidores pelo uso indevido. Os achados induzem a necessidade de realização e protocolos experimentais que possam acompanhar o perfil hormonal durante a administração do estanozolol, bem com o perfil da excreção e íons como

sódio, potássio e lítio para precisar e correlacionar as alterações morfofuncionais dos órgãos estudados.

## REFERÊNCIAS

- BAHRKE, M.S.; YESALIS, C.E.; Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Current Opinion in Pharmacology* 2004, 4:614–620.
- BOCALINE, D.S.; BEUTEL, A.; Treadmill Exercise Training Prevents Myocardial Mechanical Dysfunction Induced by Androgenic- Anabolic Steroid Treatment in Rats. *PLoS ONE*, 2014.
- BREUER, M.E. et al.; Aggression in Male Rats Receiving Anabolic Androgenic Steroids: Effects of Social and Environmental Provocation. *Hormones and Behavior* 40, 409–418 (2001).
- BUSARDÒ, F.P. et al.; Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. *Current Neuropharmacology*, 2015, Vol. 13, No. 1.
- CAMARGO, I.C.C. et al.; Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66 (2014) 195–202.
- CAMILETTI-MOIRÓN D. et al.; High-intensity Exercise Modifies the Effects of Stanozolol on Brain Oxidative Stress in Rats. *Int J Sports Med*, 2015; 36: 984–991.
- Carvalho et al.; Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Revista Ceres*, 56(1): 051-057, 2009.
- CASTRO et al.; Padronização da avaliação da função renal de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora. *J Bras Nefrol* 2014;36(2):139-149.
- CUNHA, T. S. et al.; Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.
- CUNHA, T.S. et al.; Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sciences* 77, 2005. 1030–1043.
- DESHMUKH et al.; Determination of stanozolol and 30 - hydroxystanozolol in rat hair, urine and serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemistry Central Journal* 2012, 6:162.

D'ERRICO, S. DI BATTISTA, B. Renal Heat Shock Proteins Over Expression Due to Anabolic Androgenic Steroids Abuse. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, Vol. 11, No. 5.

HARDT, A. et al.; Development of Hepatocellular Carcinoma Associated with Anabolic Androgenic Steroid Abuse in a Young Bodybuilder: A Case Report. *Case Reports in Pathology*, 2012.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E.; *Biologia e Clínica de coelhos e roedores*, 3. ed., São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1993, 238p.

HARTGENS, F., KUIPERS, H.; Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med* 2004;34:513-54.

KICMAN, A.T.; Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology* (2008) 154, 502–521.

MARAVELIAS, C.; Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicology Letters* 158, 2005. 167–175.

MULLEN, J.E. et al.; Perturbation of the Hematopoietic Profile by Anabolic Androgenic Steroids. *Journal of Hormones*, 2014.

NERI, M., BONSIGNORE, A.; Anabolic Androgenic Steroids Abuse and Liver Toxicity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11, 430-437.

OBERHOLZER, M. Östreicher M, Christen H, Brühlmann M.; Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell. Biol*, 1996. 105: 333-355.

PERES, S.B.; LUCIANO E. Influências de esteroide anabólico (Deca Durabolin) sobre o metabolismo de ratos submetidos ao treinamento físico. *Ver. Paul. Educ. Phys.* 9:131–137, 1995.

POELMANS, S.; Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. *Analytica Chimica Acta* 473, 2002. 39–47.

REVAI, T.; SAPI, Z.; BENEDEK, S.; KOVACS, A.; KASZAS, I.; VIRANYI, M.; WINKLER, G. Severe nephrotic syndrome in a young man taking anabolic steroid and creatine long term. *Orv. Hetil.*, v.144, n.49, p.2425-2427, 2000.

ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H.; O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab.* 2014;9 (2):98–105.

TÖLGYESI, Á.; SHARMA, V.K.; Confirmatory analysis of stanozolol metabolites in bovine, pig and sheep urines using an optimized clean-up and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 88, 2014. 45–52.

WELDER, A.A.; Toxic Effects of Anabolic-Androgenic Steroids in Primary Rat Hepatic Cell Cultures. JPM Vol. 33, No. 4, August 1995; 187-195.

YOSHIDA et al.; At what price, glory? Severe cholestasis and acute renal failure in an athlete abusing stanozolol. CMAJ 1994;151:791-3.

## TABELAS E FIGURAS

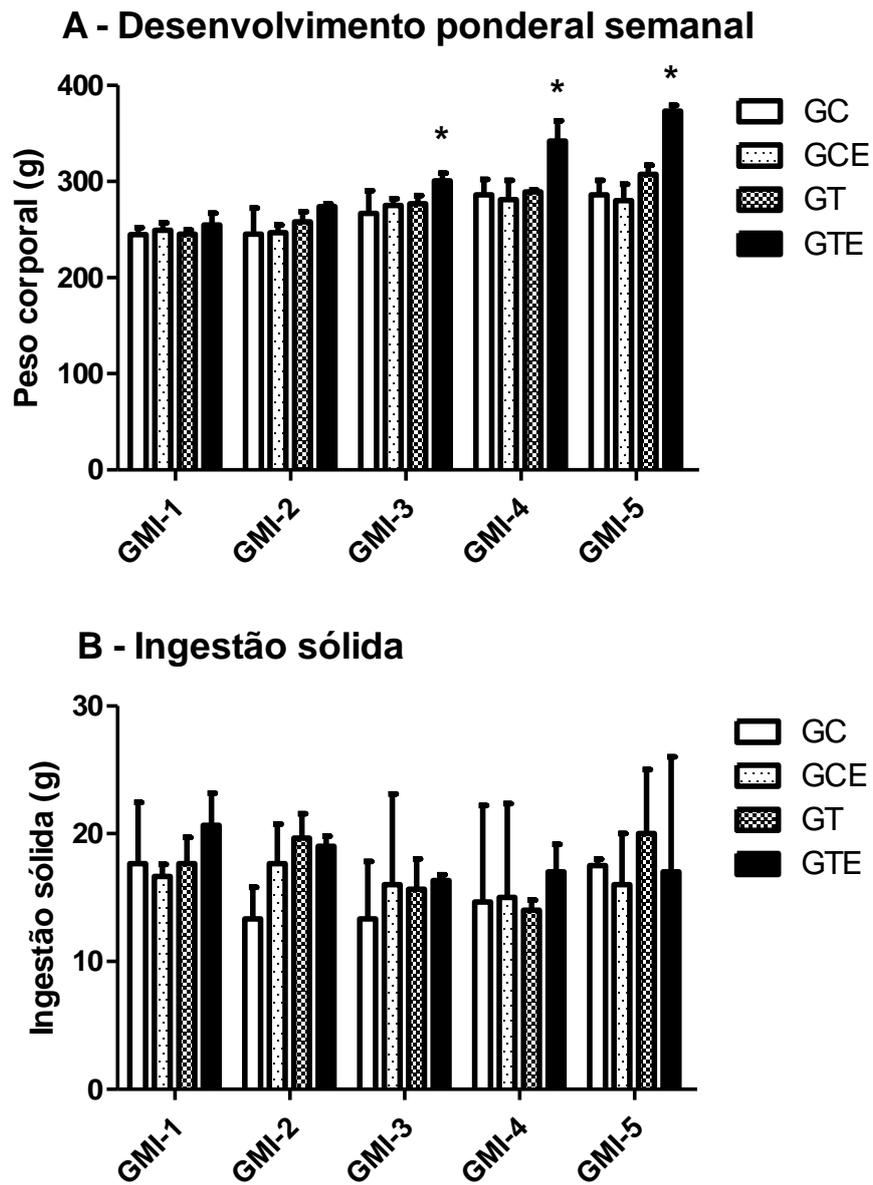
Tabela 1: Análise física, química e microscópica da urina (urinálise) realizada durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI) de 24 horas (n=5).

Grupos	GC	GCE	GT	GTE
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Odor	Sui generis	Sui generis	Sui generis	Sui generis
Aspecto	Turvo	Turvo	Turvo	Turvo
Densidade	1.043	1.041	1.035	1.047
Depósito	Presente	Presente	Presente	Presente
pH	8	8	8	8
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Corpos cetônicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glicose	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas	2	2	2	1
Sangue	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinogênio	Normal	Normal	Normal	Normal

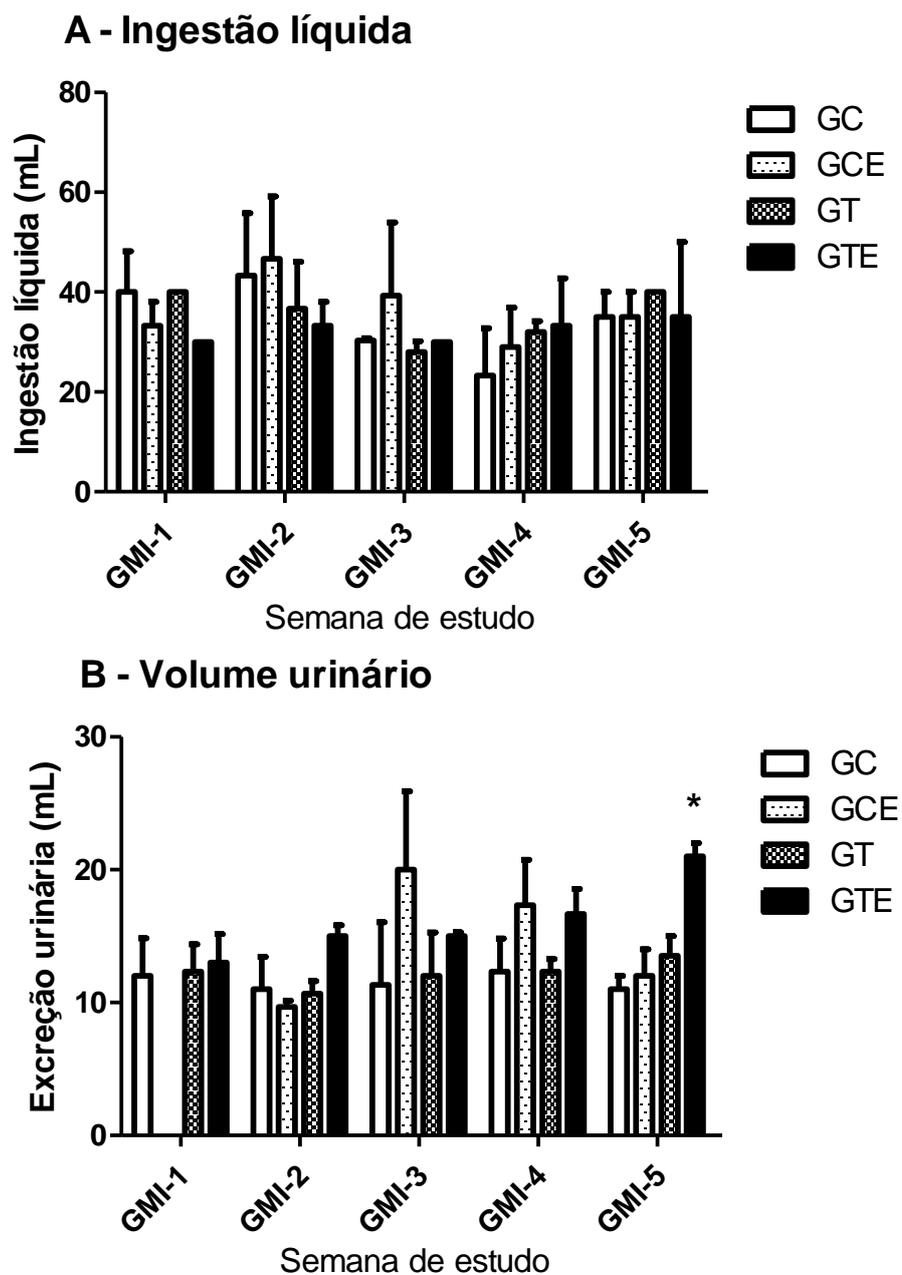
Tabela 2: <sup>1</sup>Média e desvio padrão dos hemogramas realizados com ratos tratados com estanozolol (n=5).

Grupos	GC	GCE	GT	GTE
HE (x10 <sup>6</sup> /μL)	7,68 ± 0,33	7,78 ± 0,45	7,35 ± 0,32	7,50 ± 0,24
HB (g/ dL)	16,62 ± 0,67	16,84 ± 1,00	16,07 ± 0,61	16,20 ± 0,53
Ht (%)	50,00 ± 2,00	50,60 ± 2,94	48,00 ± 2,12	48,75 ± 1,64
VCM (fL)	65,06 ± 0,27	65,02 ± 0,15	65,25 ± 0,32	64,95 ± 0,22
CHCM (g/dL)	33,22 ± 0,07	33,28 ± 0,04	33,50 ± 0,35	33,22 ± 0,04
Leucócitos (μL)	6.800 ± 1,63	7.480 ± 2,03	7.175 ± 1,18	6.025 ± 1,79*
Linfócitos (%)	66% ± 0,05	64% ± 0,10	73% ± 0,06*	60% ± 0,09*
Plaquetas (μL)	487.10 ± 65.20	556.560 ± 44.57	592.150 ± 60.55	478.525 ± 77.02*
Prot. totais (g/dL)	7,16 ± 0,23	7,20 ± 0,25	7,00 ± 0,14	6,40 ± 0,20*

(legenda tabela acima: <sup>1</sup> Médias seguida por asterisco diferem significativamente do controle (p<0,05))



**Figura 1:** **A** - Desenvolvimento ponderal dos animais (g) ao longo do estudo de Gaiola Metabólica Individual (GMI) Média  $\pm$ desvio padrão; **B** - Ingestão sólida, em 24 horas, expressa em (g) durante o estudo da Gaiola Metabólica Individual (GMI).



**Figura 2:** A - Ingestão líquida em 24 horas dos ratos ao longo do estudo de Gaiola Metabólica Individual (GMI); B - Volume urinário em 24 horas nos ratos ao longo do estudo de Gaiola Metabólica Individual (GMI), expresso em mL.

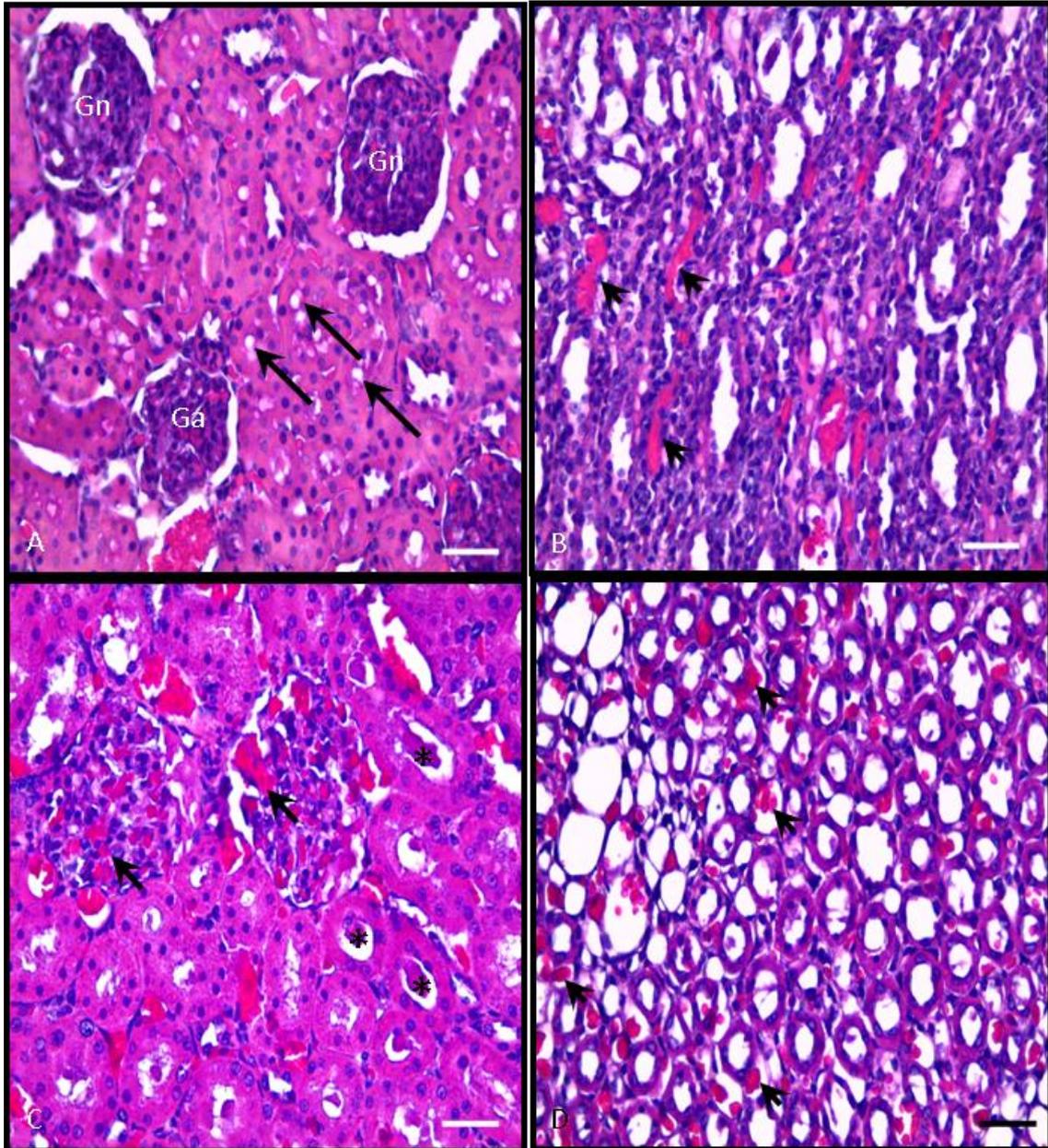
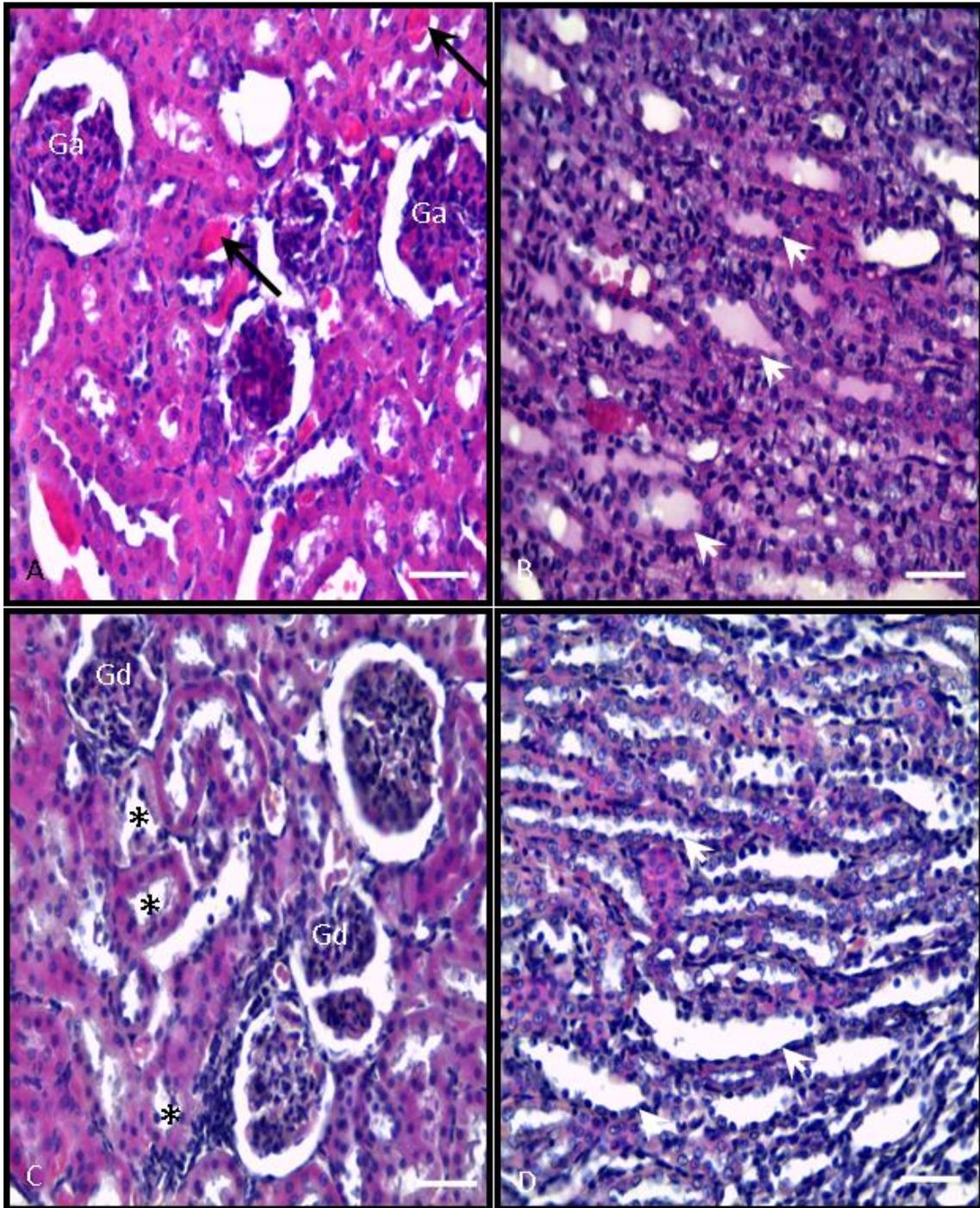


Figura 3: Rins dos animais dos grupos GC (A-B) e GCE (C-D). A - notar glomérulos normal (Gn), atrofiado (Ga) e o túbulo contorcido proximal com presença de alguns vacúolos (setas longas). B - congestão discreta na região medular (ponta de setas). C - congestão glomerular (setas curtas) e túbulos renais com presença de material eosinofílico intra luminal (asteriscos). D - congestão na região medular (ponta de setas). Barras 50µm. H.E.



**Figura 4:** Rins dos animais dos grupos GT (A-B) e GTE (C-D). A - notar glomérulos atrofiados (Ga) e o túbulo contorcido proximal com presença de material eosinófilo no seu lúmen (setas longas). B - congestão na região medular (ponta de setas). C - degeneração dos glomérulos (Gd) e túbulos renais com morfologia alterada (asteriscos). D - degeneração dos túbulos coletores (ponta de setas). Barras 50µm. H.E.

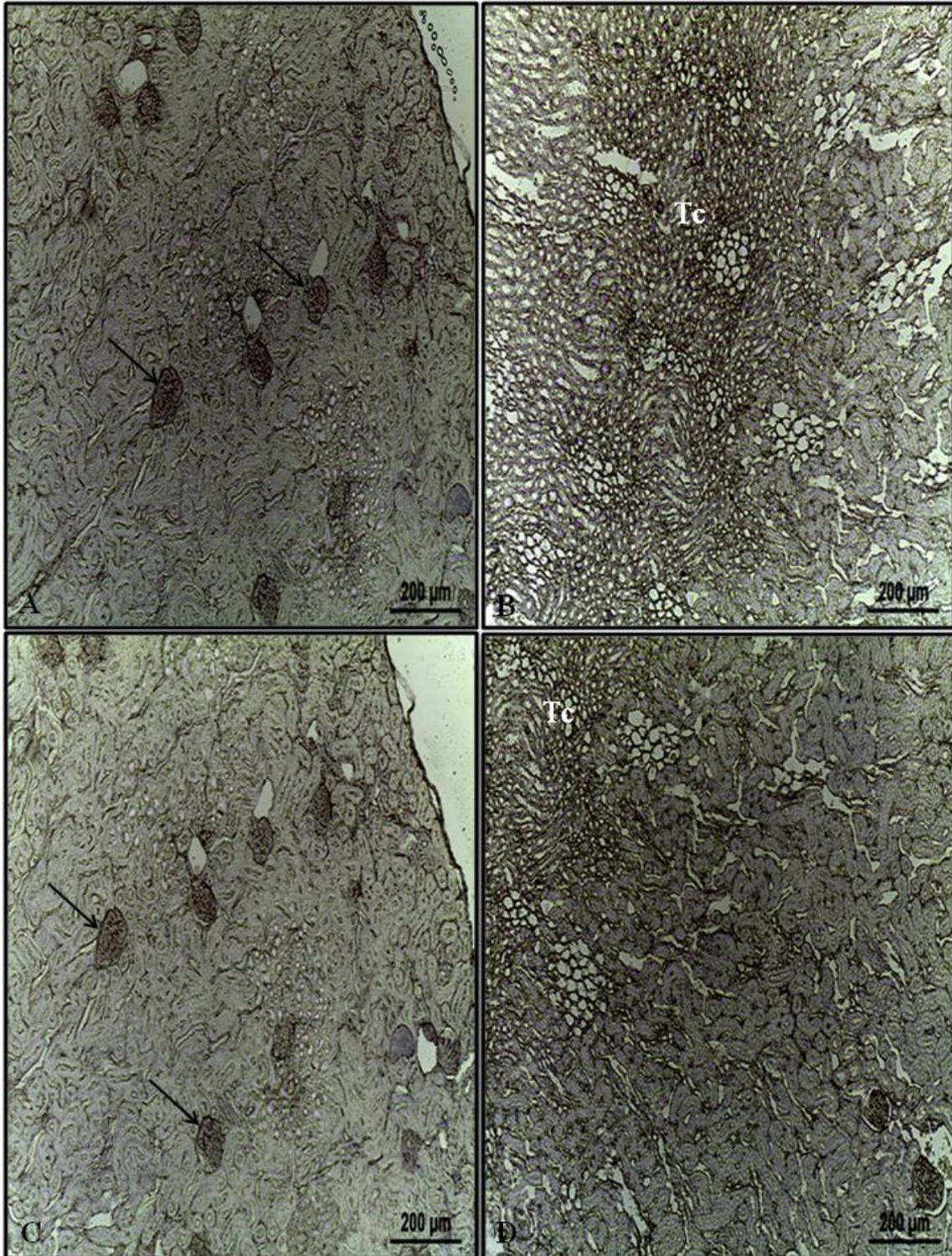


Figura 5: Imunohistoquímica para o VEGF-A nos rins dos animais. Controle: A (região cortical) e B (região medular), observar marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Exercício: C (região cortical) e D (região medular), observar também marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Glomérulos renais (setas) e Túbulos coletores (Tc).

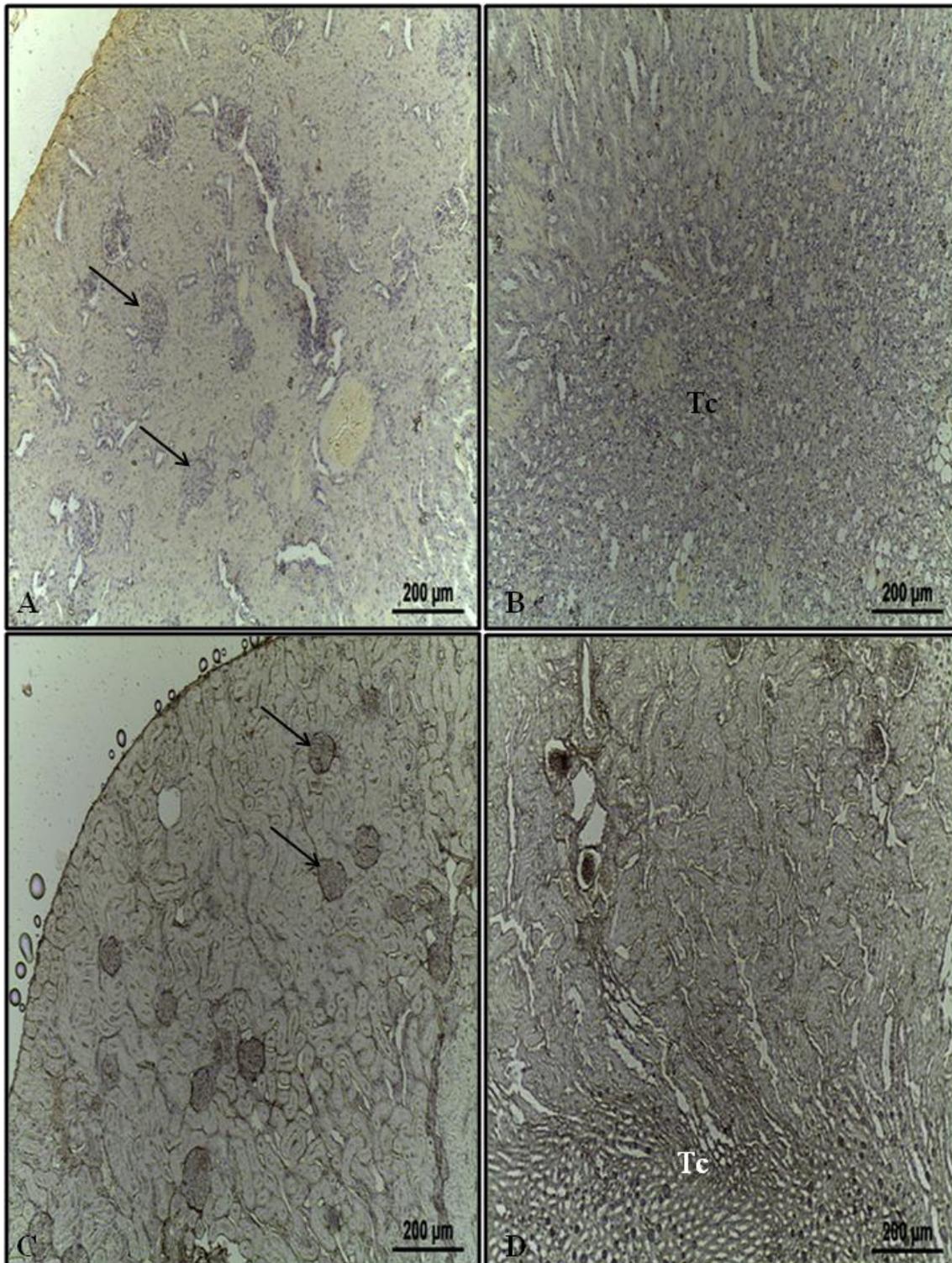


Figura 6: Imunohistoquímica para o VEGF-A nos rins. Anabolizante: A (região cortical) e B (região medular) e GTE: C (região cortical) e D (região medular), observar fraca de marcação nos glomérulos renais e tubos coletores. Glomérulos renais (setas) e Túbulos coletores (Tc).

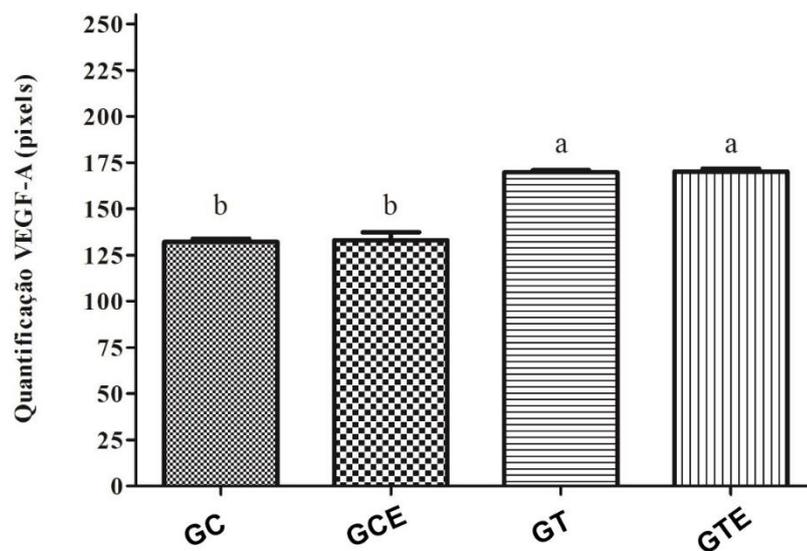


Figura 7: Quantificação em pixels da expressão do fator VEGF-A. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos controle e exercício e em relação aos outros. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ( $p < 0,05$ ).

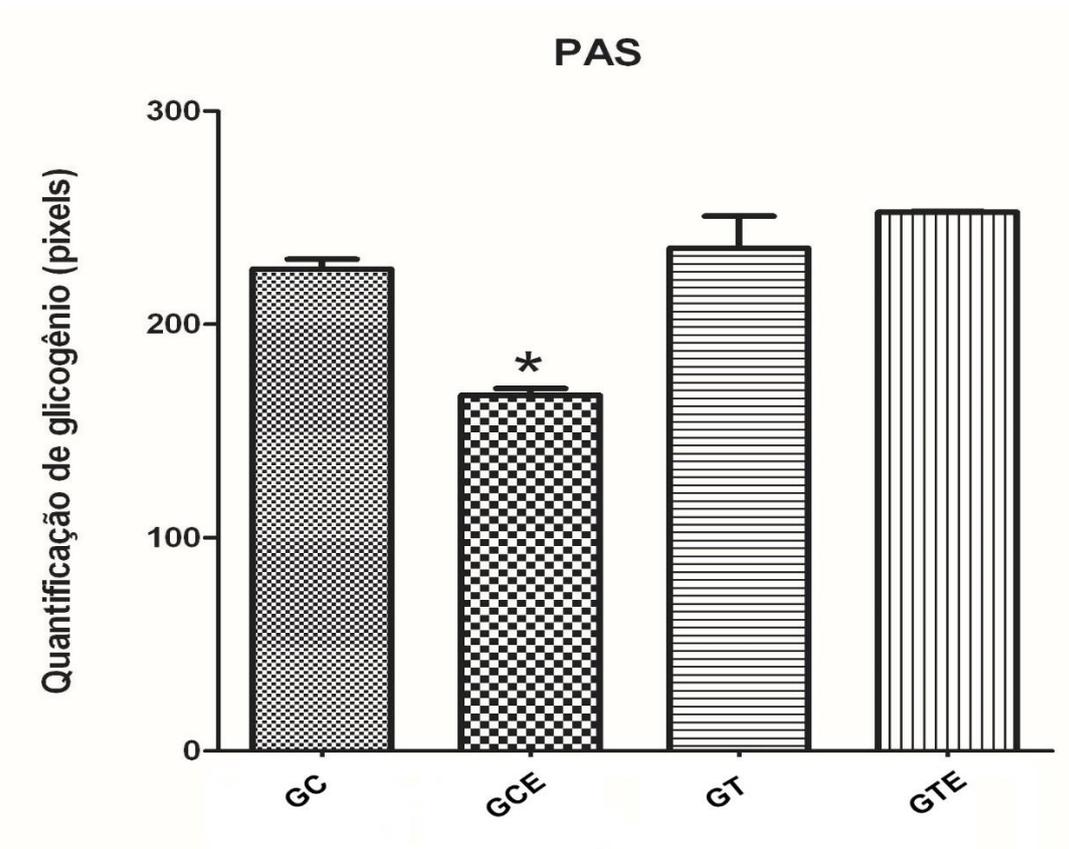


Figura 8: quantificação de glicogênio pelo método PAS.

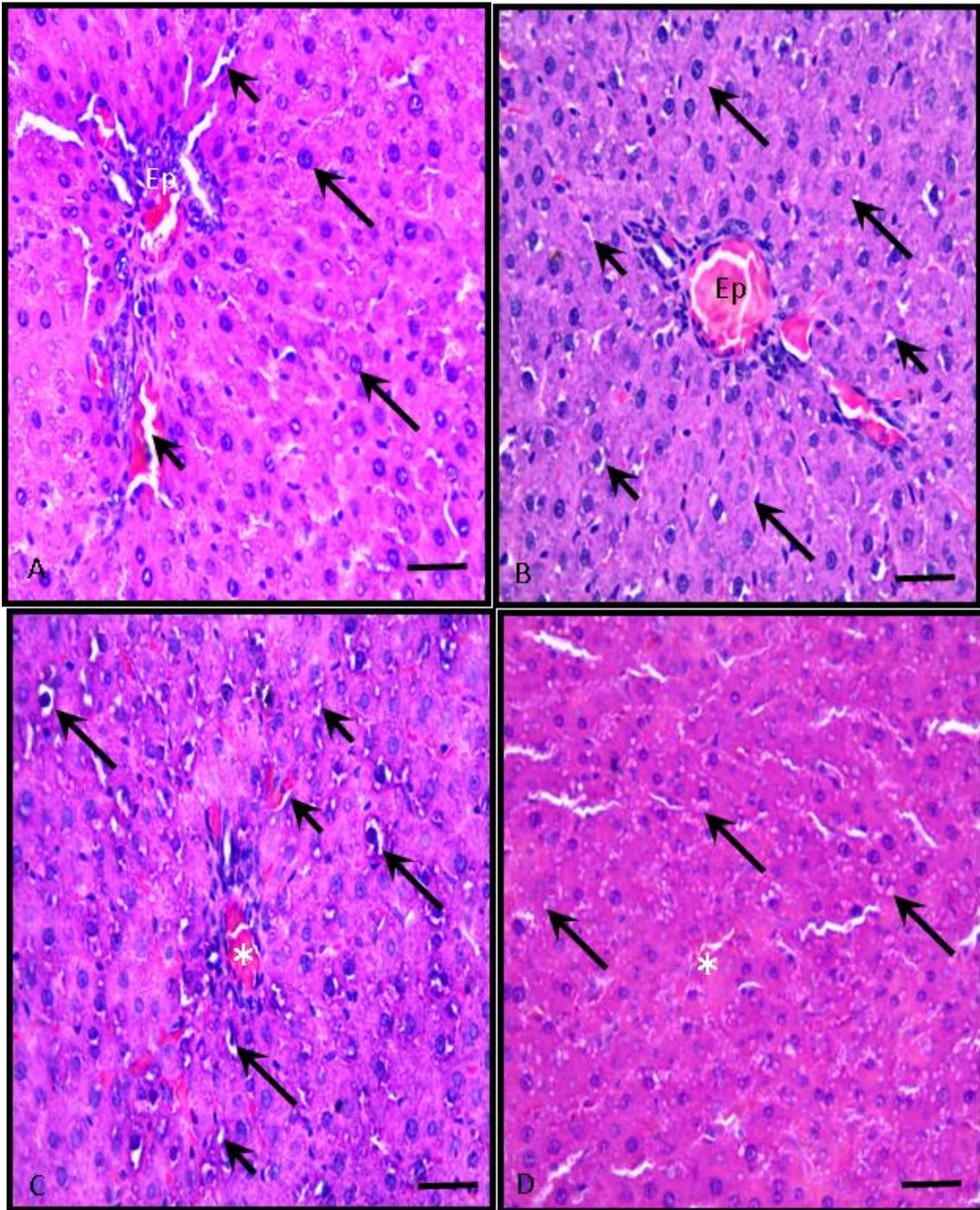


Figura 9: Fígado dos animais dos grupos GC (A), GCE (B), GT (C) e GTE (D). A - notar parênquima hepático com cordões de hepatócitos (setas longas), espaço porta (Ep) e sinusóides (setas curtas) bem preservados. B - Observar hepatócitos hipertróficos (setas longas) e redução do espaço do capilar sinusóide (setas curtas). C e D - congestão de veia hepática (asterisco), vacuolização dos hepatócitos (setas longas) e atrofia dos capilares sinusóides e). Barras 50µm. H.E.

## **Política Editorial**

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

## **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

## **Orientação para tramitação de artigos**

- **Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).**

- **Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.**
- **Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.**
- **A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.**
- **Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.**
- **Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.**
- **É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.**
- **O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.**

## **Comitê de Ética**

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

## **Tipos de artigos aceitos para publicação**

### **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

### **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

### **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

## Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

## Formatação do texto

- **O texto não deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.**
- **Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.**

## Seções de um artigo

**Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

**Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. **o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;**
2. **o texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação.**

**Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em

um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

**Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco.

**Introdução:** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

**Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do CEUA (verificar o Item Comitê de Ética).

**Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

*Tabela:* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

*Figura:* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto

preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

**Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

**Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **sem** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

**Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

**Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, adaptadas para o ABMVZ conforme exemplos:

**Como referenciar:**

### 1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- **autoria única:** (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- **dois autores:** (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- **mais de dois autores:** (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- **mais de um artigo citado:** Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

*Citação de citação:* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já **citada por** outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

***Comunicação pessoal:* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.**

**2. Periódicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação avulsa** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de

Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**4. Documentos eletrônicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- **Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.**
- **O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência e/ou "Aguardando liberação do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.**

### **Taxas de submissão e de publicação**

- **Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$50,00 (cinquenta reais) deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.**
- **Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$150,00, por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.**

### **Recursos e diligências**

- **No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.**
- **No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).**