



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAMÃO SOUZA DE DEUS JUNIOR

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE ANABOLIZANTES EM
RATOS WISTAR ADULTOS

REPRODUCTIVE TOXICOLOGIC EVALUATION OF ANABOLIC-
ANDROGENIC STEROIDS IN WISTAR MALE RATS

CAMPINAS

2019

RAMÃO SOUZA DE DEUS JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE ANABOLIZANTES EM
RATOS WISTAR ADULTOS**

**REPRODUCTIVE TOXICOLOGIC EVALUATION OF ANABOLIC-
ANDROGENIC STEROIDS IN WISTAR MALE RATS**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Cell Biology and Structural with an emphasis in Cell Biology.

Orientadora: Dra. Mary Anne Heidi Dolder

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAMÃO SOUZA DE DEUS JUNIOR E ORIENTADA PROFESSORA DRA. MARY ANNE HEIDI DOLDER.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D488a Deus Junior, Ramão Souza, 1985-
Avaliação da toxicidade reprodutiva de anabolizantes em ratos Wistar adultos / Ramão Souza de Deus Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Mary Anne Heidi Dolder.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Toxicologia. 2. Esteróides anabólicos. 3. Testículos. 4. Hormônios. 5. Reprodução. I. Dolder, Mary Anne Heidi, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Reproductive toxicologic evaluation of anabolic-androgenic steroids in Wistar male rats

Palavras-chave em inglês:

Toxicology

Anabolic steroids

Testis

Hormones

Reproduction

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Mary Anne Heidi Dolder [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Rejane Maira Goes

Silvia Aparecida Oesterreich

Raquel Frenedoso da Silva

Data de defesa: 29-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0002-8551-1787>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1810722193782827>

Campinas, 27 de setembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Dra. Rejane Maira Góes

Dra. Silvia Aparecida Oesterreich

Dra. Raquel Frenedoso da Silva

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me guiar durante os momentos difíceis e a minha família, por serem minha fortaleza, com eles eu jamais esmorecerei.

Agradecimentos

Agradeço aos meus amigos, aos velhos e aos novos. Aos velhos pelas preocupações e apoio com o desenvolvimento do doutorado. Aos novos, por ter tido a chance de conhecê-los nesta nova etapa da minha vida.

Agradeço aos funcionários das duas instituições que estive durante o doutorado, que sempre me atenderam com educação e me ajudaram no que foi solicitado.

Agradeço aos meus colegas de trabalho e a Universidade Federal da Grande Dourados, por me darem a chance de concluir mais esta fase da minha vida acadêmica, quem sabe assim, realizar meu desejo profissional.

Agradeço a equipe ReproTox, aprendemos e nos divertimos muito neste tempo que passei com vocês. Faria tudo outra vez.

Agradeço a UFGD, pelo incentivo a qualificação, a UNESP por disponibilizar o espaço para realização desta pesquisa e a UNICAMP pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.

Agradeço a professora Wilma, quem me ajudou no desenvolvimento da pesquisa.

E a professora Heidi, minha orientadora, pela sua compreensão e disponibilidade em me ajudar... sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são drogas sintéticas derivadas da testosterona com efeitos anabólicos relacionados ao aumento da massa muscular. Estudos sobre os efeitos de anabolizantes sobre a reprodução masculina são escassos, porém, já é de conhecimento que o uso dos EAAs pode estar relacionado a diminuição do volume, função e quantidade das células de Leydig, células responsáveis pela produção de testosterona, associado a diminuição de LH. Assim, este estudo teve como finalidade avaliar a toxicidade dos EAAs decanoato de nandrolona (DN), estanozolol e oximetolona sobre parâmetros reprodutivos de ratos *Wistar* machos adultos (avaliação imediata) e depois reavaliar as possíveis alterações após repouso, sem tratamento por 70 dias (avaliação tardia). Foram utilizados 236 ratos, sendo 136 machos e 100 fêmeas (75 dias). Na avaliação imediata, os animais foram divididos em três tratamentos diferentes de acordo com as medicações estudadas. E dentro de cada grupo de EAA eles foram divididos em três grupos novamente (n=7), o grupo controle, o tratado com menor dose (5 mg/Kg) e o tratado com maior dose (10 mg/Kg). Os animais tratados com estanozolol e decanoato de nandrolona receberam injeções intramusculares semanais diluídas em salina e extrato vegetal respectivamente por 70 dias e os tratados com oximetolona receberam gavagem diluída em salina, por 40 dias. Após a eutanásia, nesses animais foram realizadas pesagem corporal final e de órgãos, técnicas de qualidade espermática, avaliação histopatológica do testículo, morfometria testicular, dinâmica do ciclo da espermatogênese e dosagens hormonais. Ainda, 10 ratos e 100 fêmeas foram utilizados para inseminação artificial intrauterina. Na avaliação tardia, foram utilizados 63 ratos divididos em 9 grupos (n=7), da mesma forma que no primeiro experimento, para reavaliar se alguns parâmetros analisados tiveram recuperação. Na avaliação imediata tanto o peso de órgãos quanto todos os parâmetros de qualidade espermática (morfologia, motilidade, contagem, produção diária espermática e tempo de trânsito espermático) apresentaram alterações nos EAAs estudados. Na avaliação tardia, a oximetolona apresentou lenta recuperação, o estanozolol teve uma recuperação parcial dos efeitos deletérios e o DN apresentou aumento de alterações. Na primeira avaliação da dosagem hormonal, a oximetolona e o estanozolol apresentaram diminuição das concentrações de FSH, LH e testosterona intratesticular, enquanto o DN não apresentou alterações nesta avaliação. Porém, na avaliação tardia, na oximetolona as concentrações dos hormônios se normalizaram, porém houve redução da concentração de progesterona; o estanozolol reestabeleceu seus hormônios a normalidade e o DN apresentou reduções nas concentrações de LH, testosterona e testosterona intratesticular. Na inseminação artificial intrauterina, os valores mostram que houve uma redução em ambos os grupos tratados com DN e estanozolol no potencial fértil e aumento das perdas pré-implantação e no grupo tratado com DN com a maior dose foi, ainda, demonstrado aumento nas perdas pós-implantação. Sendo assim, este trabalho demonstrou que os EAAs podem causar problemas ligados a qualidade espermática e desregulação hormonal o que pode levar a redução da fertilidade masculina, e ainda, que a duração dos efeitos pode variar de acordo com o tipo de anabolizante utilizado, sendo o DN considerado neste estudo o mais perigoso, por seus efeitos piorarem após o repouso de 70 dias de tratamento.

Palavras-chave: Toxicologia, esteroides anabólicos androgênicos, testículos, hormônios, reprodução masculina.

ABSTRACT

Anabolic-Androgenic Steroids (AAS) are synthetic medicines derived from testosterone that produce anabolic-related increase in muscle mass. Studies that evaluate the effects of anabolic steroids on male reproduction are scarce; never the less it was observed that the use of AAS diminished Leydig cell function, which are the cells responsible for testosterone production, number and volume of these cells, and are associated with low LH levels. Thus, this study investigated the impact of using the AAS: nandrolone decanoate (ND), stanozolol and oxymetholone on reproductive parameters of adult male Wistar rats. For this experiment, 173 Wistar rats, 73 males and 100 females, of reproductive age were used (75 days old). The rats ($n = 7$) were divided into 9 groups, divided into 2 groups according to the dose of the AAS administered (5 mg/Kg and 10 mg/Kg). The groups nandrolone decanoate and stanozolol received the treatment during 10 weeks by a weekly injection with dilution in vegetable oil or saline solution, respectively, while those with oxymetholone diluted in saline solution were treated by gavage for 40 days. These animals were assessed in relation to final body and reproductive organs weights, sperm quality and hormonal dosages. Also, 10 rats and 100 females were used for artificial intrauterine insemination. In the second experiment, 63 rats were divided into 9 groups ($n = 7$), in the same way as the first experiment, to assess whether recovery had occurred in any of the parameters analyzed. The parameters analyzed included both organ weight and all sperm quality parameters (morphology, motility, count sperm, daily sperm production and sperm transit time though epididymis) and showed alterations in the AAS studied. In the late evaluation, oxymetholone showed a slower recovery, stanozolol had a partial recovery from deleterious effects and ND showed an increase in alterations. In the first evaluation of hormonal dosage, oxymetholone and stanozolol showed decreased FSH, LH and intratesticular testosterone levels while ND did not alter the hormone levels. However, in the late evaluation, in oxymetholone the hormone levels normalized but there was a reduction in the progesterone level, while stanozolol restored hormones to normality and ND showed reductions in LH, testosterone and intratesticular testosterone levels. In intrauterine artificial insemination the values show that there was a reduction of the fertility potential of both groups treated with ND and stanozolol, as well as increased pre-implantation losses. In the group treated with the higher dose of ND, an increase in post-implantation losses was also demonstrated. Thus, this study demonstrated that the use of AAS caused decreased sperm quality and may cause problems related to male infertility. Recuperation time varies according to the type of anabolic steroid used, where ND was considered the most dangerous, according to this study because the deleterious effects worsened 70 days after the end of the treatment.

Keywords: Toxicology, anabolic-androgenic steroids, testicles, hormones, male reproduction

SUMÁRIO

I – Introdução	10
II – Revisão de Literatura	12
1 – Testosterona	12
2 - Esteróide Anabólicos Androgênicos	15
2.1 - <i>Decanoato de Nandrolona</i>	17
2.2 - <i>Estanozolol</i>	18
2.3 - <i>Oximetolona</i>	19
3 - Testículos	19
3.1 - <i>Túbulos seminíferos</i>	20
3.2 - <i>Células de Sertoli</i>	21
3.3 - <i>Células de Leydig</i>	23
3.4 - <i>Espermatogênese</i>	24
3.5 - <i>Espermatozoides</i>	24
4 - Epidídimo	25
5 - Uso de EAA	27
III - Justificativa	28
IV - Objetivos gerais	29
V- Resultados e Discussão	30
VI - Bibliografia	31
Capítulo I - Avaliação da Toxicidade Reprodutiva de Ratos Tratados com Oximetolona	37
Resumo	38
Introdução	39
Materiais e Métodos	40
Resultados	45
Discussão	47
Conclusão	50
Agradecimentos	50
Bibliografia	50
Apêndices	54
Capítulo II - A Reversibilidade de Efeitos Deletérios na Reprodução é Possível Após o Tratamento com Estanozolol em Ratos?	67
Resumo.....	68
Introdução	69
Material e métodos	71
Resultados	77
Discussão	89
Conclusão	93
Bibliografia.....	93
Capítulo III - Os Efeitos Deletérios Reprodutivos se Agravam Dias Após Tratamento com Decanoato de Nandrolona em Ratos	97
Resumo.....	98
Introdução	99
Material e métodos	100
Resultados	106
Discussão	118
Conclusão	122
Bibliografia.....	122
VII - Conclusão geral	126
VIII- Bibliografia geral	127
IX - Anexos	135

I - INTRODUÇÃO

Em busca de corpos esculturais e midiaticamente perfeitos, o uso de esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) por atletas e frequentadores de academias está se tornando um problema crescente (Clark, Harrold et al., 1997, Feinberg, Lumia et al., 1997, Albertson, Chenoweth et al., 2016, Salerno, Cascio et al., 2018, Tofighi, Ahmadi et al., 2018). Os anabolizantes são medicamentos sintéticos derivados de andrógenos, hormônios sexuais masculinos. Segundo o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), muitos homens e mulheres de todas as faixas etárias, porém com maior frequência entre 18 a 34 anos, abusam da terapêutica deste fármaco e arriscam a saúde em busca de fins estéticos, não levando em consideração o risco que o uso de esteroides acarreta (Carlini, 2007, Kim and Wood, 2014). Diversos estudos já comprovaram que o uso de anabolizante está relacionado a problemas endócrinos, cardiovasculares, hepáticos, psicológicos e sexuais (Pope and Katz, 1994, Yesalis and Bahrke, 1995, Evans, 2004, Shokri, Hemadi et al., 2014).

Com o intuito de intensificar o desempenho físico, potencializar o ganho de massa muscular, aumentar a força e diminuir o tempo de recuperação dos músculos, usuários de anabolizantes consomem excessivas doses deste fármaco nas formas oral e injetável, enfrentando vários efeitos nocivos ao organismo. Este medicamento tem efeito benéfico nas fibras musculares dos usuários porque aumenta a síntese proteica, promove a retenção de nitrogênio, inibe o catabolismo proteico e aumenta a reprodução celular destas fibras (Celotti and Negri Cesi, 1992, Kennedy and O'Sullivan, 1997, Takahashi, Tatsugi et al., 2004).

No Brasil, a venda deste tipo de fármaco, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é restrita e feita somente mediante apresentação de receita médica para diversos fins terapêuticos, onde estão inseridos os tratamentos para algumas anemias, hipogonadismo em adultos, alguns tipos de cânceres e anabolismo proteico (Snyder, 1984). Embora com a venda controlada a compra de anabolizantes mais que dobrou em um período de 5 anos, em 2009 vendeu 113.016 caixas e em 2014 passou a vender, 294.205 caixas, lembrando que estes são dados oficiais e ligados ao

Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC), mas em sua maioria os esteroides são obtidos de forma clandestina e ilegal (Silva, Maranhao Neto et al., 2017).

A venda ilícita de EAAs é difícil de ser controlada e na maioria das vezes acontece dentro da própria academia, instituição que deveria promover a saúde de seus frequentadores. Outro motivo que dificulta o controle do consumo dos EAAs é a livre comercialização em países fronteiriços como o Paraguai, o que facilita a entrada ilegal deste medicamento no Brasil (Ames and Souza, 2012, Moraes, 2015).

Contudo, mesmo com programas governamentais antianabolizantes, advertindo sobre os efeitos e riscos do uso dos esteroides, em academias esportivas, o uso continua indiscriminado (Gronbladh, Johansson et al., 2013). A ideia de corpo saudável mediante o uso de EAAs é superficial, levando em consideração a cascata de reações adversas e efeitos colaterais que ocasionam o emprego indevido destas substâncias (Magnusson, Hanell et al., 2009). Os diversos efeitos colaterais, diante do uso desta medicação, estão comprovados em vários estudos, entre eles os mais comuns estão: androgenização (aumento de características masculinas, tais como voz grossa, pelos pelo corpo, aumento de libido, entre outros), atrofia testicular, câncer de próstata, retenção de líquidos, acne, alterações do humor e ginecomastia (Parkinson and Evans, 2006, Melnik, Jansen et al., 2007, Ahmed, 2015).

Os testículos são as gônadas masculinas responsáveis pela produção dos espermatozoides, porém a maturação e a motilidade, capacidades essenciais para que essas células realizem a fecundação, acontecem nos epidídimos (de Kretser, 1979, Ban, Komatsu et al., 1995, Burns, 2007, Ellis and Mahadevan, 2014). As avaliações dos testículos, bem como o das células exclusivas deste órgão como é o caso das células de Leydig e Sertoli, dos epidídimos e de outros órgãos reprodutores revelam muito sobre a saúde sexual dos machos (Tyl, 2002). Por sua vez, as células de Leydig tem como principal função a produção de testosterona e seus derivados, enquanto as células de Sertoli servem principalmente, como apoio e fonte de nutrição para as fases iniciais dos espermatozoides (Gwatkin, 1993).

Diversos estudos relatam o tratamento com EAAs em animais simulando os efeitos deste medicamento no comportamento e no organismo dos usuários humanos (Shokri, Hemadi et al., 2014), como por exemplo, os estudos experimentais de Kim *et al.* (2014) e Clark *et al.* (1997) que demonstram comprometimento do comportamento sexual e emocional pelo uso de anabolizantes, tornando os usuários mais agressivos e com disfunções sexuais, deixando em evidência que estes comportamentos agressivos podem ser controlados. Ainda, segundo Shokri *et al.* (2014), o uso suprafisiológico do decanoato de nandrolona, pode estar relacionado ao aumento de danos no DNA dos espermatozoides, diminuindo a qualidade espermática e reduzindo o número de fêmeas prenhes. Outro estudo, realizado em ratos, aponta que o uso de EAAs está associado a uma diminuição do volume, função e quantidade de células de Leydig, que pode ser associada a diminuição de Hormônio Luteinizante – *Luteinizing Hormone* (LH) ocasionada pelo uso de EAAs (Feinberg, Lumia et al., 1997). Os estudos apontam que na dose correta este tipo de medicação possui efeitos benéficos e ajudam no tratamento de várias doenças, porém, o excesso nas dosagens e uso sem necessidade acarretam em diversos problemas físicos e emocionais (1999, Vargas, Oliveira et al., 2013).

Diante do exposto, este estudo tem como finalidade avaliar os efeitos toxicológicos nos principais órgãos reprodutores, na qualidade espermática e na fertilidade de ratos *Wistar* expostos aos EAAs. Analisa ainda, se os possíveis efeitos causados pelo uso de anabolizantes são recuperados após pausa no tratamento de 70 dias, buscando fornecer dados que acrescentem à literatura científica atual, mostrando as adversidades da utilização deste tipo de medicamento, para evitar o uso desnecessário dos EAAs.

II - REVISÃO DE LITERATURA

1- Testosterona

Os hormônios são substâncias químicas que, em sua maioria, circulam na corrente sanguínea e que são secretadas por células e órgãos, com função de produzir efeitos fisiológicos reguladores em tecidos-alvos (Cunha, Cunha et al.,

2004). Estes podem ser classificados quanto suas propriedades químicas em peptídicos e proteicos, derivados de aminoácidos ou esteroides, bem como quanto a sua síntese e armazenagem, solubilidades, receptores e mecanismos de ação. Os hormônios esteroides são complexas cadeias lipídicas, tendo o colesterol como precursor e podem ser exemplificados pela progesterona, cortisol, testosterona, progesterona, entre outros (Schanzer, 1996, Gronbladh, Johansson et al., 2013).

Esteroides androgênicos (do grego “*andro*”, significa macho ou homem) é o termo utilizado para os hormônios sexuais masculinos, que tem duas principais funções: funções androgênicas, ligadas a reprodução e caracterização masculina, como o crescimento do pênis, espaçamento das cordas vocais, aumento da libido, aumento da secreção nas glândulas sebáceas, aumento de pelos no rosto e no corpo e padrão masculino dos pelos pubianos; e as funções anabólicas, aumento de massa muscular esquelética, aumento na concentração da hemoglobina, aumento do hematócrito, aumento na retenção de nitrogênio, redução dos estoques de gordura corporal e aumento da disposição de cálcio nos ossos (Ghaphery, 1995, Schiffer, Arlt et al., 2018).

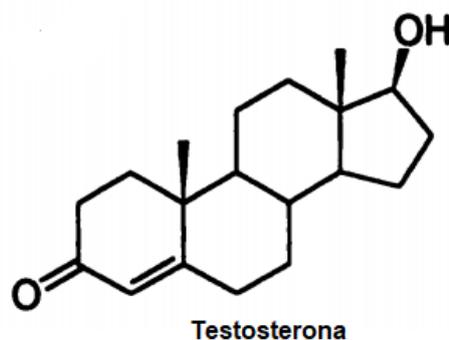


Figura 1 – Molécula de Testosterona (Schanzer, 1996).

A testosterona (Figura 1) e a diidrotestosterona são os principais esteroides androgênicos, sendo que o segundo é sintetizado a partir do primeiro e são os hormônios típicos masculinos mais biologicamente ativos, sendo que a diidrotestosterona é o mais potente androgênico natural (Goodale, Sadhu et al., 2017). A testosterona é produzida, cerca de 95%, pelas células de *Leydig* nos testículos. Quando a concentração deste hormônio está baixa e isto é

reconhecido pelo hipotálamo, o hormônio de liberação de gonadotrofinas hipotalâmico - *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) é secretado. Este hormônio age na hipófise e estimula a liberação do hormônio folículo estimulante – *follicle stimulating hormone* (FSH) do hormônio luteinizante - *luteinizing hormone* (LH), sendo que o primeiro estimula as células de Sertoli na realização da gametogênese e o segundo, que em machos pode ser chamado de hormônio estimulador da célula intersticial – *interstitial cell stimulating hormone* (ICSH), estimula as células de Leydig a secretar os hormônios endógenos masculinos. Esta sucessão de eventos acontece no chamado eixo hipotálamo-hipófise testicular, por causa dos órgãos envolvidos no processo (Figura 2). A testosterona também é produzida no córtex das glândulas adrenais em ambos os sexos, controlado pela ação da corticotropina. Nas fêmeas, este hormônio é produzido pelos ovários, obviamente em quantidade bem inferior do que nos testículos (Silva, Danielski et al., 2002, Cunha, Cunha et al., 2004).

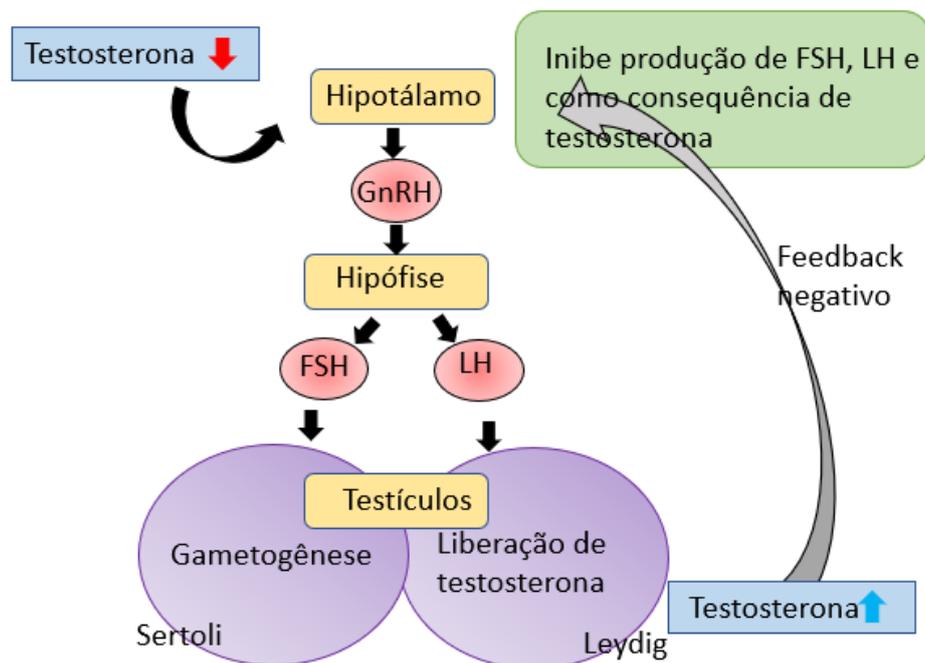


Figura 2 – Esquema para produção de testosterona.

Na circulação, somente 1-2% das moléculas de testosterona são encontradas livres, a maior parte deste hormônio circulante está ligado a proteínas plasmáticas (proteína ligante do hormônio sexual, albumina e outras

proteínas plasmáticas), que tem a função de transportar a testosterona até a célula-alvo (Wilson, 1988, Goodale, Sadhu et al., 2017). Após a chegada na célula, a proteína transportadora se desliga do hormônio e a testosterona atravessa com facilidade pela membrana plasmática, devido sua característica lipossolúvel. No interior da célula, ligam-se a receptores andrógenos citosólicos e se deslocam para o núcleo, onde o complexo hormônio-receptor se liga ao DNA nuclear na região elemento de resposta ao hormônio e acontece a transcrição ou repressão de alguns genes (Higgins and Gehring, 1978).

2 - Esteroides Anabólicos Androgênicos

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs), segundo alguns autores, incluem a testosterona, seus derivados endógenos e suas formas sintéticas. Entretanto, de acordo com outros pesquisadores, este termo está relacionado somente às formas sintéticas desta substância, também conhecidos popularmente como anabolizantes ou “bombas”, já que essas drogas possuem função anabólica superior à função androgênica (Hoberman and Yesalis, 1995, Goldberg, MacKinnon et al., 2000, Kam and Yarrow, 2005, Drobnis and Nangia, 2017).

Os EAAs são formas sintéticas de hormônios andrógenos como a testosterona e são produzidas a partir desta molécula e de seus derivados, com modificações na estrutura molecular, como observamos na Figura 3 (Barone, Pitruzzella et al., 2017). Os primeiros anabolizantes foram criados em 1935 e eram conhecidos pelos nomes de metiltestosterona, mestanolona e metrandiol, através da metilação do C17 da molécula de testosterona (Shahidi, 2001).

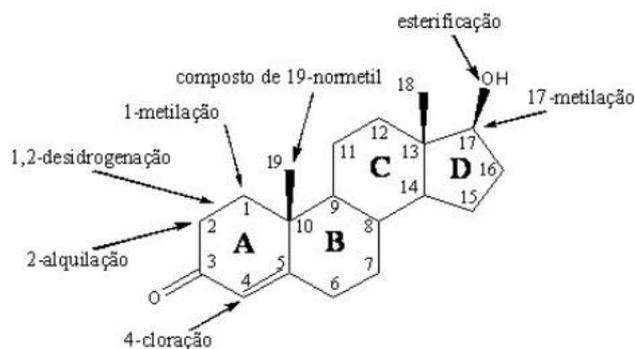


Figura 3 - Possíveis modificações na molécula de testosterona, Dornas (2008).

Os EAAs foram criados para auxiliar na terapia clínica, e atualmente são utilizados em casos de deficiência natural de andrógenos (hipogonadismo, micropênis neonatal, crescimento e puberdade atrasadas, etc.), na recuperação de cirurgias e atrofia muscular, nos tratamentos de câncer de mama, anemia, sarcopenia em pacientes idosos e osteoporose (Schanzer, 1996, Silva, Danielski et al., 2002, Dornelles, Bueno et al., 2017).

Os EAAs agem no organismo, produzindo efeitos hipertróficos, através da ligação dessa substância aos receptores androgênicos, promovendo um balanço positivo nitrogenado, ou seja, um aumento na síntese e diminuição da degradação de proteínas. Eles ainda podem ativar as células satélites o que acarreta no aumento do miotúbulo e alargamento do diâmetro das fibras musculares esqueléticas. Além de inibir a ação catabólica (diminuição de massa magra) dos glicocorticoides, os EAAs competem pelos seus receptores, o que aumenta a reserva de glicogênio e a preservação da massa magra. Além disso, seus efeitos psicológicos auxiliam na performance do treino, através da diminuição da sensação de cansaço e aumento da capacidade de recuperação dos músculos (Higgins and Gehring, 1978, Rocha, 2007, Rubinow, 2017).

No entanto, o uso de EAAs, apesar de alguns efeitos colaterais conhecidos, ganhou destaque e continua em alta prevalência entre atletas profissionais e amadores, o que causa extrema preocupação na saúde pública (Sjoqvist, Garle et al., 2008). Entre os efeitos adversos estão a ginecomastia (em homens), aumento de doenças renais, hepáticas e vasculares, depressão, aumento da agressividade, diminuição das funções cognitivas e masculinização (em mulheres), porém esses efeitos possíveis parecem não preocupar os usuários de anabolizantes (Pope and Katz, 1994, Takahashi, Tatsugi et al., 2004, Angell, Chester et al., 2012, Busardo, Frati et al., 2015).

Estudos com dados epidemiológicos, mostram que nos EUA de 3 - 3,5 milhões de americanos são usuários deste tipo de medicamento, sendo mais comum em homens jovens, na adolescência (Bahrke, Yesalis et al., 2000, Shokri, Hemadi et al., 2014, Kantarci, Punduk et al., 2017). Estudos no Brasil, apesar de escassos com essa finalidade, mostram resultados de que cerca 2% dos jovens em idade escolar já fizeram uso de anabolizantes e ainda que elevadas porcentagens de frequentadores de academia admitem fazer uso dos EAAs ,

números que ficam entre 11,1 e 24% (Silva and Moreau, 2003, Silva, Machado Júnior et al., 2007, Iriart, Chaves et al., 2009).

A administração desses hormônios sintéticos é realizado por doses suprafisiológicas (10-100 vezes) bem maiores que as doses terapêuticas e podem ser administrados de forma isolada ou em associação em tratamentos conhecido popularmente como “ciclos” (Clark, Harrold et al., 1997, Kuhn, 2002). Os ciclos costumam variar de 4 a 14 semanas, podendo ser diário ou semanal e via intramuscular ou oral, dependendo da droga e podem ser repetidos várias vezes alternando-se as drogas (Silva, Danielski et al., 2002, Santos, Mendonça et al., 2006).

Entre as EAAs mais utilizadas estão a decanoato de nandrolona, fenilpropionato de nandrolona, cipionato de testosterona e o estanozolol, que são anabolizantes injetáveis e a oximetolona, oxandrolona e estanozolol, com tratamento por via oral (Schanzer, 1996, Fink, Schoenfeld et al., 2018, Ganesan and Pellegrini, 2018).

2.1 - Decanoato de nandrolona

A nandrolona endógena, que circula normalmente na corrente sanguínea, tem estrutura química e funcionalidade parecidas com a testosterona, porém tem efeitos anabólicos 10 vezes mais fortes que o hormônio endógeno masculino. É produzida como bioproduto de reações bioquímicas e seu principal metabólito é a norandrosterona. Sua forma comercial é a decanoato esterificado, conhecido como decanoato de nandrolona (DN) ou 17 β -hidroxi-19-nor-4-androsten-3-um (Figura 4). O DN é utilizado em vários tratamentos clínicos, como em queimados, várias formas de anemias, pacientes com doenças debilitarias (HIV) e osteoporose (Ahmed, 2015, Busardo, Frati et al., 2015, Min and Lee, 2018). No entanto, é uma medicação famosa entre jovens e adultos pelos efeitos anabólicos que ela possibilita, sendo uma dos EAAs mais utilizados no mundo, sendo um líquido viscoso e injetável por via intramuscular (Cunha, Cunha et al., 2004).

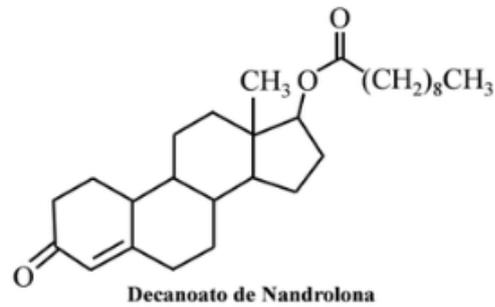


Figura 4 – Molécula de decanoato de nandrolona, Schanzer (1996).

2.2 – Estanozolol

O estanozolol (também conhecido comercialmente como Winstrol) é derivado da diidrotestosterona não aromatizado e deriva da α -alquilação do C17 (Figura 5) (Wilson, 1988). Seus metabólitos mais comuns são o 3'-hidroxiestanozolol, 4- β -hidroxiestanozolol e 16- β -hidroxiestanozol (Tsitsimpikou, Chrisostomou et al., 2011, Kioukia-Fougia, Georgiadis et al., 2017). Pode ser encontrado nas formas de uso oral e injetável intramuscular e é um dos mais utilizados EAAs, muito conhecido por jovens e adultos com a intenção de melhorar sua performance e aparência física que apostam em esteroides androgênicos com elevada atividade anabólica e efeitos androgênicos mínimos (Ozcagli, Kara et al., 2018). Clinicamente é utilizado nos tratamentos de sarcopenia, osteoporose, perda muscular e artrite reumatoide, seus principais efeitos são seu potencial em influenciar a estruturação de massa magra, reparação tecidual, a fibrinólise, a síntese de colágeno e o metabolismo ósseo, devido a sua atividade anabólica (Castro Martins, Peffers et al., 2018).

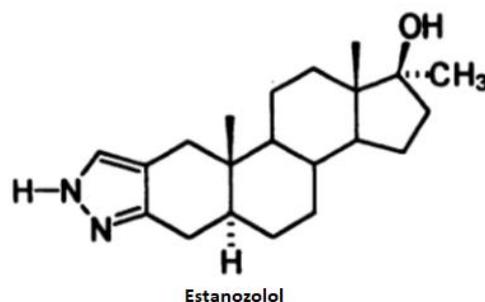


Figura 5 – Molécula de Estanozolol, Schanzer (1996).

2.3 - Oximetolona

A oximetolona ou 17 β -hidroxi-2-hidroxiimileno-17 α -metil-5 α -androstan-3-um (Figura 6), derivado da testosterona, é um dos anabolizantes mais utilizados pelos usuários de EAAs, já que seu tratamento é por via oral e tem como metabolitos principais o 2 ξ -hidroximetil-17 α -metil-17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-um e o 2 ξ -hidroximetil-17 α -metil-5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (Adhikary and Harkness, 1971, MacDonald, Sykes et al., 1973, Zahmatkesh, Najafi et al., 2014). Este andrógeno, tem como principal função a estimulação de hematopoiese na medula óssea e é muito utilizado no tratamento de anemias, hipogonadismo, puberdade retardada, câncer de mama, leucemia, em pacientes com HIV, queimados, fraturas severas e recuperação de cirurgias (Khan, Bibi et al., 2012, Zhang, Benedetti et al., 2015). É um anabolizante perigoso pela sua alta taxa hepatotóxica e sua carcinogenicidade está sendo estudada, devido pacientes tratados a longo prazo com essa medicação apresentarem câncer no fígado (1999).

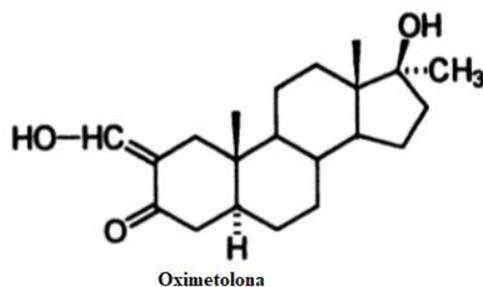


Figura 6 – Molécula de oximetolona, Schanzer (1996).

3 – Testículos

Os testículos são gônadas com funções exócrina e endócrina, neles são produzidos os gametas e hormônios ligados ao sexo masculino (Russell, Ettlín et al., 1993). É envolto externamente pela túnica albugínea, uma camada espessa de tecido conjuntivo fibroso, que forma o mediastino testicular através de septos que se projetam para parte interna do testículo dividindo-o em lóbulos (Figura 7). Este órgão pode ser dividido em dois compartimentos, o germinativo (tubular) e o intersticial, de acordo com sua funcionalidade (Fawcett, Neaves et al., 1973, Russell, Ren et al., 1990).

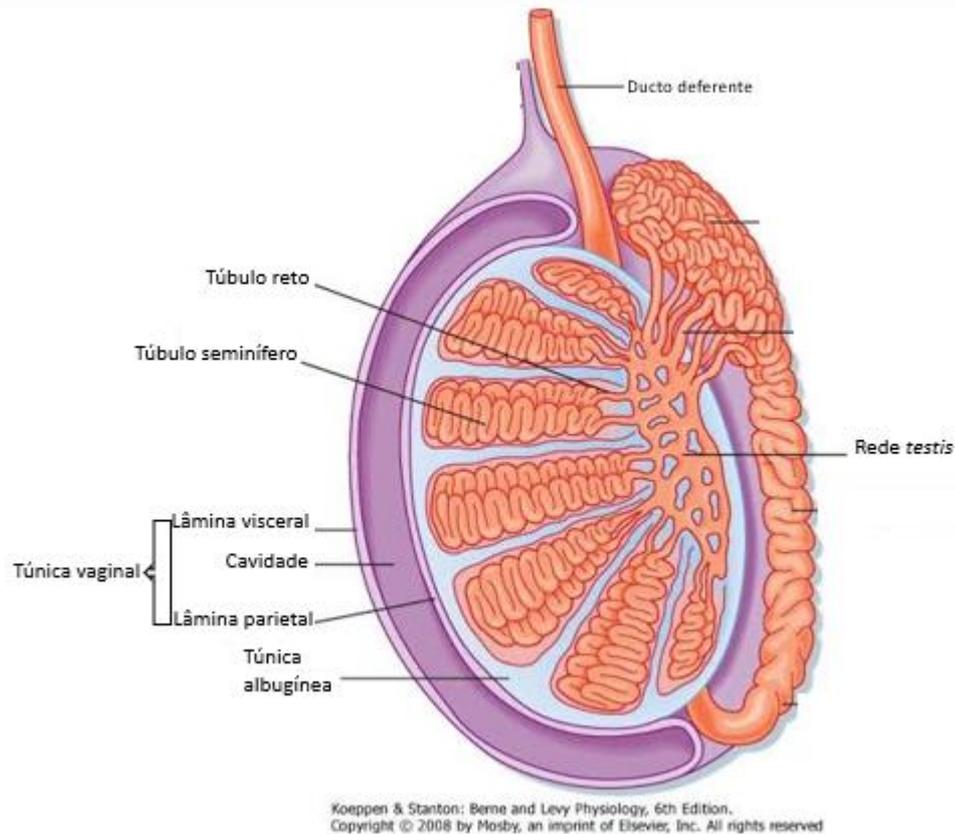


Figura 7 – Anatomia do testículo adaptado de Koeppen (2008)..

3.1 – Túbulos seminíferos

Os túbulos seminíferos constituem a maior parte do parênquima testicular na maioria das espécies, sendo assim, indica a proporção da produção espermática. Estes túbulos são alças contorcidas com duas extremidades conectadas à *rede testis* através do túbulo reto e são formados por células de Sertoli, células de linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), que formam o epitélio seminífero e pelas células mióides que formam o tecido peritubular (Figura 8) (Gwatkin, 1993, Russell, Ettlín et al., 1993).

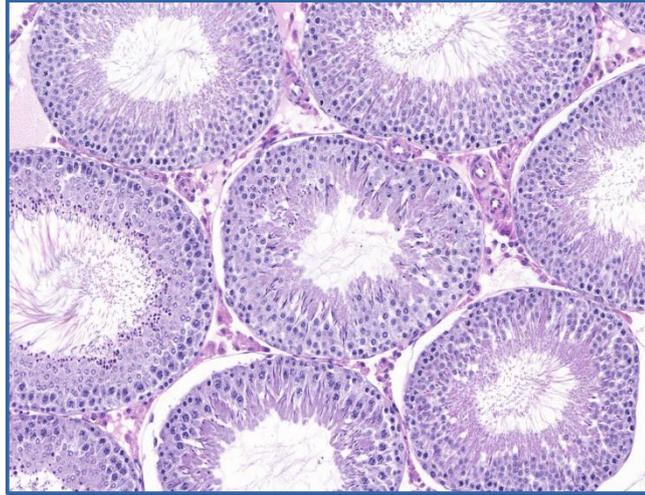


Figura 8 – Túbulos seminíferos de testículo de rato.

3.2 – Células de Sertoli

As células de Sertoli são células colunares, com núcleo grande e tripartido e formato irregular, que estão aderidas à membrana basal e se prolongam até ao lúmen do túbulo, unidas através de junções oclusivas que resultam na divisão do epitélio em duas áreas distintas (Figuras 9 e 10). O ambiente basal, abaixo das junções das células, onde são encontradas as espermatogônias e os espermatócitos primários no início da prófase. O ambiente adluminal consiste nos espermatócitos primários que migram através da barreira hemato-testicular, entram na fase de zigóteno e se desenvolvem em espermatócitos secundários, e também é o ambiente que localizam as espermátides. Obtém-se assim locais distintos, propiciando um ambiente isolado e imunoprivilegiado, o que é um fator importante para o desenvolvimento da espermatogênese (Russell and Peterson, 1985, Costa, da Matta et al., 2011)

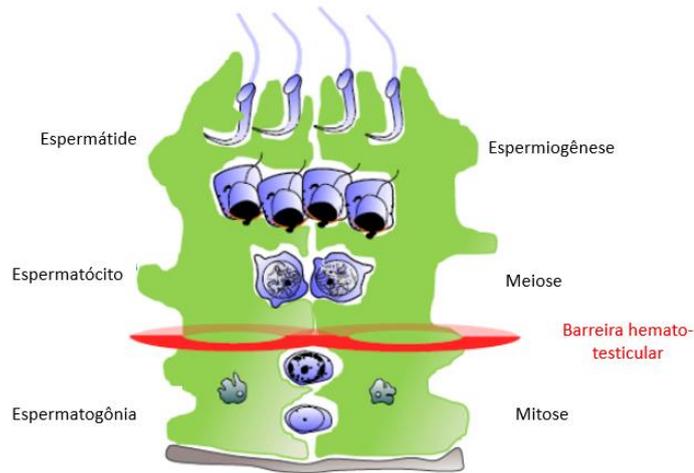


Figura 9 – Representação das células germinativas, das fases da espermatogênese e da barreira hemato-testicular em túbulo seminífero. Adaptado de O'Donnell, Stanton et al. (2000) .

As células de Sertoli tem como função de fagocitar células em degeneração na espermatogênese, dão suporte e nutrem as células germinativas, secretam proteínas ligantes de andrógeno e promovem a comunicação célula-célula o que garante a sincronia na espermatogênese (Russell, Ettlín et al., 1993, Monsees, Franz et al., 2000).

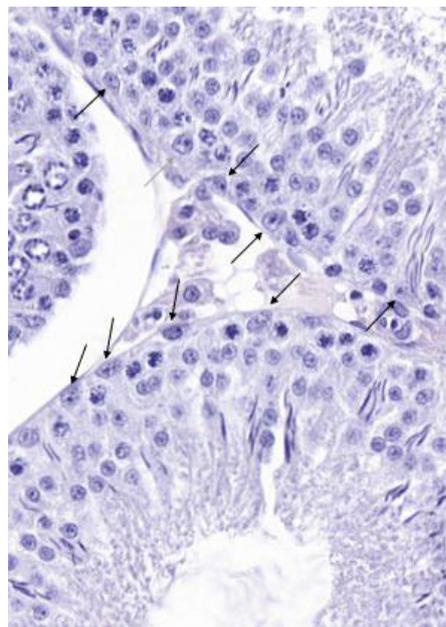


Figura 10 – Células de Sertoli em túbulos seminíferos de testículo de rato apontadas pelas setas.

3.3 – Células de Leydig

No compartimento intersticial, entre os túbulos seminíferos, estão as células de Leydig que são as células mais abundantes neste ambiente e exercem a função endócrina nos testículos (Figura 11). Essas células são grandes, poliédricas, têm o núcleo arredondado, nucléolo proeminente, possuem gotículas de lipídios em seu citoplasma e são ricas em retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares (Russell, Ren et al., 1990, Dong, 2017). As células de Leydig surgem nos testículos ainda no embrião e podem ser de duas gerações diferentes em ratos: fetal e adulta. Em humanos pode ser definido um tipo intermediário, a geração neonatal. A célula de Leydig fetal, age até 3 meses após o nascimento e produz andrógenos responsáveis pela masculinização do feto. Já a célula de Leydig adulta, é a responsável pela produção da testosterona, sendo a principal secretora deste hormônio em machos, sendo que a síntese de testosterona, depende da ligação de LH aos receptores que estão na superfície das células de Leydig (Ge, Chen et al., 2008, Zirkin and Papadopoulos, 2018).

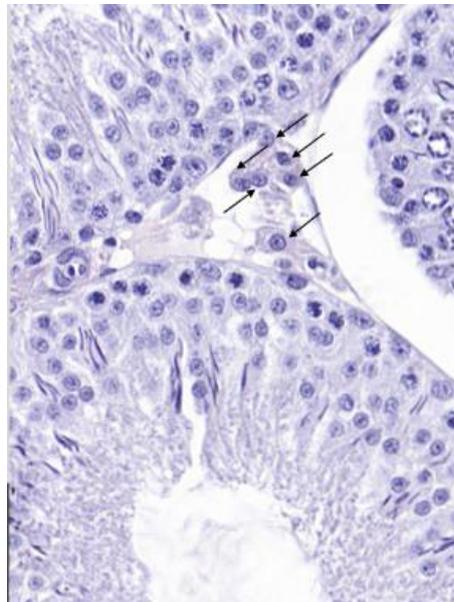


Figura 11 – Células de Leydig em testículos de ratos apontadas pelas setas.

3.4 - Espermatogênese

A espermatogênese é um processo fisiológico que ocorre dentro dos túbulos seminais e consiste na produção de espermatozoides haploides a partir de células germinativas primitivas diploides (de Kretser, Loveland et al., 1998).

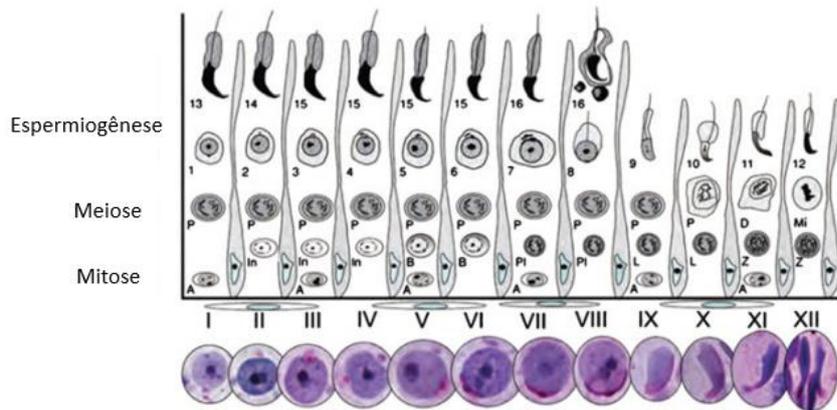


Figura 12 – Fases do ciclo espermatogênico, onde pode se observar as células germinativas em suas três fases, espermatogônia, espermatócito e espermátide. Adaptado de Meistrich & Hess (2013).

Este processo é dividido em três fases: proliferativa, meiótica e espermiogênese. Na primeira fase, a proliferativa, espermatogônias sofrem várias e sucessivas mitoses dando origem as espermatogônias dos tipos A e B, sendo que a primeira continua a se dividir e a segunda se diferencia em espermatócito primário. Na segunda fase, através de uma meiose, são originados os espermatócitos secundários e a espermátides. Na última fase, conhecida como espermiogênese (Figura 12), não ocorre divisão celular, mas mudanças estruturais nas espermátides (Russell, Ren et al., 1990, de Kretser, Loveland et al., 1998).

3.5 – Espermatozoides

Os espermatozoides são o último estágio de maturação dos espermatócitos. São células haploides masculinas altamente especializadas, chamados de gametas, com a função de fertilizar o ovócito (gameta feminino), para dar origem a outro indivíduo. Consiste em três partes: Cabeça, peça intermediária e a cauda ou flagelo (Phillips, 1972).

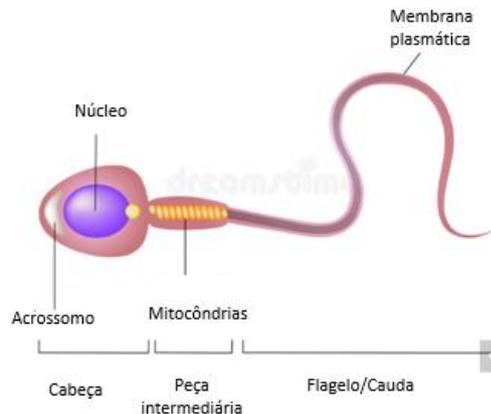


Figura 13 – Anatomia do espermatozoide. Adaptado de imagem da internet (<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-sperm-cell-vector-image84822770>)

Na cabeça dos espermatozoides está localizado o núcleo haploide, com a cromatina compactada e o acrossomo, que é uma estrutura derivada do complexo golgiense e formado principalmente por enzimas que desempenham funções essenciais para a penetração no ovócito (Figura 13) (Leuchtenberger and Schrader, 1950, Mrsny and Meizel, 1981).

Na peça intermediária, são encontradas mitocôndrias em abundância, dispostas em hélice, responsáveis pela produção de energia, indispensável para a movimento do espermatozoide (Gage, 1998).

A cauda ou flagelo, que começa na região da peça intermediária, contem nove pares de microtúbulos periféricos e um par centralmente localizado. Esta estrutura, utiliza o ATP formado pelas mitocôndrias na peça intermediária para promover a locomoção dos espermatozoides em meio líquido (Phillips, 1972, Gage, 1998).

4 – Epiddimos

Os ductos eferentes são formados pela junção dos túbulos seminíferos, e por sua vez, os ductos eferentes se juntam, dando forma a um único túbulo altamente espiralado e longo, o que varia de acordo com a espécie, tendo 1m em camundongos, 3m em ratos, 3 a 6m em humanos e até 80m em cavalos. Chamado de epidídimo (do grego, adjacente ao testículo), este órgão se encontra ao longo do testículo pstero-lateralmente por um mesentério delicado (Robaire, Hinton et al., 2006, Ellis and Mahadevan, 2014, Jones and Lopez,

2014). É no epidídimo onde ocorre a maturação, proteção, transporte, concentração, organização de moléculas que auxiliam na interação com a zona pelúcida e ganho de motilidade nos espermatozoides, assim sendo, o espermatozoide ganha a capacidade de fertilizar (Prasad and Rajalakshmi, 1976, Fernandez, Porto et al., 2008, Elfgén, Mietens et al., 2018).

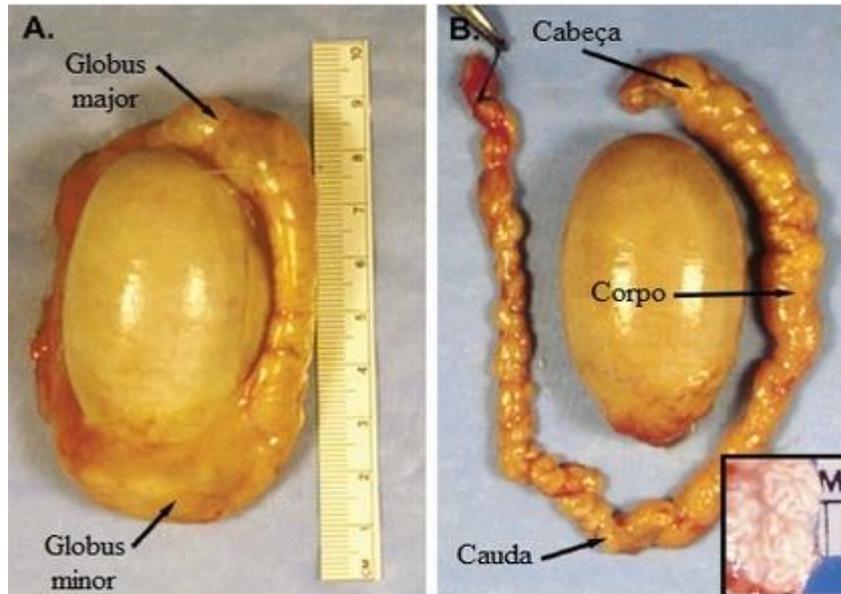


Figura 14 – Anatomia do epidídimo e suas divisões. Adaptado de Turner (2008). Sendo que em A, as setas apontam o *globus major* (região da cabeça), possui esse nome por ser uma porção mais expandida e o *globus minor* (região da cauda), porção final e mais estreita de te órgão. Em B, nota-se as três partes do epidídimo, cabeça, corpo e cauda.

O epidídimo de ratos é dividido em 3 partes: cabeça, corpo e cauda (Figura 14). Na cabeça é a porção maior do órgão onde os vasos eferentes se convergem formando um único túbulo (corpo) e então esse ducto se alarga para começar a formar o ducto deferente (cauda). Alguns autores incluem o segmento inicial, como uma quarta parte do epidídimo (Robaire, Hinton et al., 2006, Burns, 2007).

As células presentes do epidídimo são: principais, apicais, estreitas, claras, basais e halos. A célula principal é a mais comum e com função de secretar proteínas (assim como as células estreitas) e endocitar substâncias. As células apicais, pouco se sabe sobre suas funções, mas estudos recentes revelam que pode ser relacionada a capacidade de endocitar substâncias do lúmen. As células claras, são grandes e ativas, com função principal de endocitose e é mais ativa nesta função que as outras células do epidídimo. As células basais podem

secretar oligoproteínas como também podem ser responsáveis como células imunes e transportadoras de eletrólitos. Já as células halo, são as células imunes primárias no epidídimo (Prasad and Rajalakshmi, 1976, Robaire, Hinton et al., 2006).

5 – O uso de EAAs e a reprodução masculina

Os efeitos devastadores do uso de EAAs são bem descritos em artigos científicos, quando trata-se de riscos cardiovasculares, hepáticos, renais e até mesmo neurológicos (Angell, Chester et al., 2012, Kim and Wood, 2014, Busardo, Frati et al., 2015, Dornelles, Bueno et al., 2017, Goodale, Sadhu et al., 2017). Entretanto, quando o assunto é a toxicologia reprodutiva, a literatura mostra publicações relacionadas a relatos clínicos em humanos e pouco se sabe sobre a experimentação animal e quais são os reais efeitos do uso dessas drogas nos órgãos relacionados a reprodução masculina (Zahmatkesh, Najafi et al., 2014). Sabe-se ainda que muitos usuários de EAAs, desacreditam que os efeitos colaterais sejam verdadeiros ou ainda que eles não sejam permanentes (Santos, Mendonça et al., 2006).

Entretanto, alguns estudos experimentais comprovam que o uso de alguns EAAs podem estar ligados ao dano do DNA em espermatozoides, pode afetar a síntese de LH comprometendo a síntese de testosterona e a espermatogênese e ainda que aumentam a probabilidade de apoptose em células espermatogênicas, motivos que poderiam causar a infertilidade masculina (Pelletier, 1970, Shokri, Aitken et al., 2010, Shokri, Hemadi et al., 2014).

III – JUSTIFICATIVA

O uso de esteroides anabólicos androgênico está aumentando exacerbadamente. Os usuários destes medicamentos para fins estéticos se importam somente com o resultado estético e esquecem dos efeitos colaterais causados pelo abuso e exagero nas doses dos anabolizantes. Porém é necessário elucidar qual é o real impacto causado pelos EAAs no sistema reprodutor masculino, da mesma forma, demonstrar se esses efeitos persistem ou são passageiros, e ainda, se diferentes drogas tem o mesmo efeito nos órgãos ligados a reprodução nos machos.

IV – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a possível toxicidade dos esteroides anabólicos androgênicos decanoato de nandrolona, estanozolol e oximetolona, sobre parâmetros reprodutivos de ratos *Wistar* machos adultos.

Para o alcance desse objetivo, os seguintes parâmetros foram avaliados nos animais dos diferentes grupos experimentais:

- peso final do corpo e de órgão reprodutores;
- qualidade espermática, através da estimacão da contagem, morfologia e motilidade dos espermatozoides;
- concentraçã dos hormônios LH, FSH, progesterona, testosterona e testosterona intratesticular;
- fertilidade após procedimento de inseminacão artificial, método mais sensível por permitir que uma quantidade semelhante de espermatozoides seja inserida em cada corno uterino das ratas;

Ainda, reavaliar alguns parâmetros, caso sejam alterados na primeira análise, para demonstrar se essas alterações são recuperadas na avaliaçã tardia, após pausa no tratamento de 70 dias.

V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e suas discussões serão apresentados na forma de três capítulos que poderão formar a base para três artigos a serem publicados.

VI- BIBLIOGRAFIA

- (1999). "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxymetholone (CAS NO. 434-07-1) in F344/N Rats and Toxicology Studies of Oxymetholone in B6C3F1 Mice (Gavage Studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **485**: 1-233.
- Adhikary, P. M. and R. A. Harkness (1971). "The use of carbon skeleton chromatography for the detection of steroid drug metabolites: the metabolism of anabolic steroids in man." Acta Endocrinol (Copenh) **67**(4): 721-732.
- Ahmed, M. A. (2015). "Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway." Toxicol Appl Pharmacol **282**(3): 285-296.
- Albertson, T. E., J. A. Chenoweth, D. K. Colby and M. E. Sutter (2016). "The Changing Drug Culture: Use and Misuse of Appearance- and Performance-Enhancing Drugs." FP Essent **441**: 30-43.
- Ames, J. and D. Z. Souza (2012). "Counterfeiting of drugs in Brazil." Rev Saude Publica **46**(1): 154-159.
- Angell, P., N. Chester, D. Green, J. Somauroo, G. Whyte and K. George (2012). "Anabolic steroids and cardiovascular risk." Sports Med **42**(2): 119-134.
- Bahrke, M. S., C. E. Yesalis, A. N. Kopstein and J. A. Stephens (2000). "Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents." Sports Med **29**(6): 397-405.
- Ban, Y., T. Komatsu, M. Kemi, S. Inagaki, T. Nakatsuka and H. Matsumoto (1995). "Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats." Exp Anim **44**(4): 315-322.
- Barone, R., A. Pitruzzella, A. Marino Gammazza, F. Rappa, M. Salerno, F. Barone, C. Sangiorgi, D. D'Amico, N. Locorotondo, F. Di Gaudio, L. Cipolloni, V. Di Felice, S. Schiavone, V. Rapisarda, G. Sani, A. Tambo, F. Cappello, E. Turillazzi and C. Pomara (2017). "Nandrolone decanoate interferes with testosterone biosynthesis altering blood-testis barrier components." J Cell Mol Med **21**(8): 1636-1647.
- Burns, T. (2007). CHAPTER 27 - The Epididymis. Current Therapy in Equine Reproduction. J. C. Samper, J. F. Pycock and A. O. McKinnon. Saint Louis, W.B. Saunders: 171-173.
- Busardo, F. P., P. Frati, M. D. Sanzo, S. Napoletano, E. Pinchi, S. Zaami and V. Fineschi (2015). "The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system." Curr Neuropharmacol **13**(1): 122-131.
- Carlini, E. A. G., J.C.; Noto, A.R.; Carlini, C.M.; Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. (2007). "II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005." Páginas & Letras **01**: 472.
- Castro Martins, M., M. J. Peffers, K. Lee and L. M. Rubio-Martinez (2018). "Effects of stanozolol on normal and IL-1beta-stimulated equine chondrocytes in vitro." BMC Vet Res **14**(1): 103.
- Celotti, F. and P. Negri Cesi (1992). "Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics." J Steroid Biochem Mol Biol **43**(5): 469-477.
- Clark, A. S., E. V. Harrold and A. S. Fast (1997). "Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats." Horm Behav **31**(1): 35-46.
- Costa, K. L., S. L. da Matta, M. de Lucca Moreira Gomes, T. A. de Paula, K. M. de Freitas, F. de Araujo Resende Carvalho, J. de Assis Silveira, H. Dolder and S. M.

- Chamindrani Mendis-Handagama (2011). "Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield." *Anim Reprod Sci* **127**(3-4): 202-212.
- Cunha, T. S., N. S. Cunha, M. J. C. S. Moura and F. K. Marcondes (2004). "Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva." *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **40**: 165-179.
- de Kretser, D. M. (1979). "Endocrinology of male infertility." *Br Med Bull* **35**(2): 187-192.
- de Kretser, D. M., K. L. Loveland, A. Meinhardt, D. Simorangkir and N. Wreford (1998). "Spermatogenesis." *Hum Reprod* **13 Suppl 1**: 1-8.
- Dong, Q. H., M.P. (2017). *Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles*. Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles.
- Dornas, W. C. O., T.T.; Nagem, T.J.. (2008). "Anabolic steroids use and its adverse effects on the cardiovascular system." *Revista Brasileira de Farmacologia* **89**(3).
- Dornelles, G. L., A. Bueno, J. S. de Oliveira, A. S. da Silva, R. T. Franca, C. B. da Silva, M. S. Machado, L. D. Petry, F. H. Abdalla, C. L. Lhamas and C. M. de Andrade (2017). "Biochemical and oxidative stress markers in the liver and kidneys of rats submitted to different protocols of anabolic steroids." *Mol Cell Biochem* **425**(1-2): 181-189.
- Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents." *Adv Exp Med Biol* **1034**: 13-24.
- Elfgen, V., A. Mietens, M. Mewe, T. Hau and R. Middendorff (2018). "Contractility of the epididymal duct - function, regulation and potential drug effects." *Reproduction*.
- Ellis, H. and V. Mahadevan (2014). "Scrotum, testis and epididymis." *Surgery (Oxford)* **32**: e9-e16.
- Evans, N. A. (2004). "Current concepts in anabolic-androgenic steroids." *Am J Sports Med* **32**(2): 534-542.
- Fawcett, D. W., W. B. Neaves and M. N. Flores (1973). "Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis." *Biol Reprod* **9**(5): 500-532.
- Feinberg, M. J., A. R. Lumia and M. Y. McGinnis (1997). "The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats." *Physiol Behav* **62**(1): 23-30.
- Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." *Int J Androl* **31**(4): 427-437.
- Fink, J., B. J. Schoenfeld and K. Nakazato (2018). "The role of hormones in muscle hypertrophy." *Phys Sportsmed* **46**(1): 129-134.
- Gage, M. J. (1998). "Mammalian sperm morphometry." *Proc Biol Sci* **265**(1391): 97-103.
- Ganesan, K. and M. V. Pellegrini (2018). Anabolic Steroids. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Ge, R., G. Chen and M. P. Hardy (2008). "The role of the Leydig cell in spermatogenic function." *Adv Exp Med Biol* **636**: 255-269.
- Ghaphery, N. A. (1995). "Performance-enhancing drugs." *Orthop Clin North Am* **26**(3): 433-442.
- Goldberg, L., D. P. MacKinnon, D. L. Elliot, E. L. Moe, G. Clarke and J. Cheong (2000). "The adolescents training and learning to avoid steroids program: preventing drug use and promoting health behaviors." *Arch Pediatr Adolesc Med* **154**(4): 332-338.
- Goodale, T., A. Sadhu, S. Petak and R. Robbins (2017). "Testosterone and the Heart." *Methodist Deakey Cardiovasc J* **13**(2): 68-72.

- Gronbladh, A., J. Johansson, M. M. Kushnir, J. Bergquist and M. Hallberg (2013). "The impact of nandrolone decanoate and growth hormone on biosynthesis of steroids in rats." Steroids **78**(12-13): 1192-1199.
- Gwatkin, R. B. L. (1993). "The Sertoli cell, edited by Lonnie D. Russell and Michael D. Griswold, Cache River Press, Clearwater, FL, 1993, 826 pp, \$137.50." Molecular Reproduction and Development **36**(4): 517-517.
- Higgins, S. J. and U. Gehring (1978). "Molecular mechanisms of steroid hormone action." Adv Cancer Res **28**: 313-397.
- Hoberman, J. M. and C. E. Yesalis (1995). "The history of synthetic testosterone." Sci Am **272**(2): 76-81.
- Iriart, J. A., J. C. Chaves and R. G. Orleans (2009). "[Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders]." Cad Saude Publica **25**(4): 773-782.
- Jones, R. E. and K. H. Lopez (2014). Chapter 4 - The Male Reproductive System. Human Reproductive Biology (Fourth Edition). R. E. Jones and K. H. Lopez. San Diego, Academic Press: 67-83.
- Kam, P. C. and M. Yarrow (2005). "Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations." Anaesthesia **60**(7): 685-692.
- Kantarci, U. H., Z. Punduk, O. Senarslan and A. Dirik (2017). "Evaluation of anabolic steroid induced renal damage with sonography in bodybuilders." J Sports Med Phys Fitness.
- Kennedy, M. C. and A. J. O'Sullivan (1997). "Do anabolic-androgenic steroids enhance sporting performance?" Med J Aust **166**(2): 60-61.
- Khan, N. T., M. Bibi, S. Yousuf, I. H. Qureshi, N. Atta-Ur-Rahman, A. M. Al-Majid, M. A. Mesaik, A. S. Khalid, S. A. Sattar, N. Atia-Tul-Wahab and M. I. Choudhary (2012). "Synthesis of some potent immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of anabolic steroid oxymetholone." Chem Cent J **6**(1): 153.
- Kim, J. Y. and R. I. Wood (2014). "Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats." Horm Behav **66**(4): 585-590.
- Kioukia-Fougia, N., N. Georgiadis, K. Tsarouhas, F. Vasilaki, P. Fragiadaki, E. Meimeti and C. Tsitsimpikou (2017). "Synthetic and Natural Nutritional Supplements: Health "Allies" or Risks to Public Health?" Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **10**(2): 72-85.
- Koeppen, B. S. B. (2008). Berne & Levy Physiology.
- Kuhn, C. M. (2002). "Anabolic steroids." Recent Prog Horm Res **57**: 411-434.
- Leuchtenberger, C. and F. Schrader (1950). "The chemical nature of the acrosome in the male germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **36**(11): 677-683.
- MacDonald, B. S., P. J. Sykes, B. H. Kilshaw and R. A. Harkness (1973). "Proceedings: Metabolism of the hydroxymethylene group in the anabolic steroid, oxymetholone: isolation and identification of two major metabolites." J Endocrinol **59**(2): 18-19.
- Magnusson, K., A. Hanell, I. Bazov, F. Clausen, Q. Zhou and F. Nyberg (2009). "Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats." Neurosci Lett **467**(3): 189-193.
- Meistrich, M. L. and R. A. Hess (2013). "Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules." Methods Mol Biol **927**: 299-307.
- Melnik, B., T. Jansen and S. Grabbe (2007). "Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem." J Dtsch Dermatol Ges **5**(2): 110-117.
- Min, T. and K. H. Lee (2018). "Effects of nandrolone decanoate on expression of steroidogenic enzymes in the rat testis." Asian-Australas J Anim Sci **31**(5): 658-671.

- Monsees, T. K., M. Franz, S. Gebhardt, U. Winterstein, W. B. Schill and J. Hayatpour (2000). "Sertoli cells as a target for reproductive hazards." *Andrologia* **32**(4-5): 239-246.
- Moraes, T. P. B. (2015). "Anabolizantes nas buscas da WEB. Um estudo sobre o interesse sazonal por esteroides no Brasil." *RJLB*: 1979-2007.
- Mrsny, R. J. and S. Meizel (1981). "Potassium ion influx and Na⁺,K⁺-ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction." *J Cell Biol* **91**(1): 77-82.
- O'Donnell, L., P. Stanton and D. M. de Kretser (2000). *Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. Endotext*. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc.
- Ozcagli, E., M. Kara, T. Kotil, P. Fragkiadaki, M. N. Tzatzarakis, C. Tsitsimpikou, P. D. Stivaktakis, D. Tsoukalas, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis and B. Alpertunga (2018). "Stanozolol administration combined with exercise leads to decreased telomerase activity possibly associated with liver aging." *International Journal of Molecular Medicine* **42**(1): 405-413.
- Parkinson, A. B. and N. A. Evans (2006). "Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users." *Med Sci Sports Exerc* **38**(4): 644-651.
- Pelletier, J. (1970). "Mode of action of testosterone propionate on the secretion and release of luteinizing hormone (lh in the castrated ram)." *Acta Endocrinol (Copenh)* **63**(2): 290-298.
- Phillips, D. M. (1972). "Comparative analysis of mammalian sperm motility." *J Cell Biol* **53**(2): 561-573.
- Pope, H. G., Jr. and D. L. Katz (1994). "Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes." *Arch Gen Psychiatry* **51**(5): 375-382.
- Prasad, M. R. N. and M. Rajalakshmi (1976). "Comparative physiology of the mammalian epididymis." *General and Comparative Endocrinology* **28**(4): 530-537.
- Robaire, B., B. T. Hinton and M.-C. Orgebin-Crist (2006). CHAPTER 22 - The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. J. D. Neill. St Louis, Academic Press: 1071-1148.
- Rocha, F. L. R., F.R.; Oliveira, E.M.. (2007). "Anaboli steroids: action mechanism and effects on the cardiovascular system." *O mundo da saúde São Paulo* **31**(4): 470-477.
- Rubinow, K. B. (2017). "Estrogens and Body Weight Regulation in Men." *Adv Exp Med Biol* **1043**: 285-313.
- Russell, L. D., R. A. Ettlin, A. P. S. Hikim and E. D. Clegg (1993). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." *International Journal of Andrology* **16**(1): 83-83.
- Russell, L. D. and R. N. Peterson (1985). "Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates." *Int Rev Cytol* **94**: 177-211.
- Russell, L. D., H. P. Ren, I. Sinha Hikim, W. Schulze and A. P. Sinha Hikim (1990). "A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell." *Am J Anat* **188**(1): 21-30.
- Salerno, M., O. Cascio, G. Bertozzi, F. Sessa, A. Messina, V. Monda, L. Cipolloni, A. Biondi, A. Daniele and C. Pomara (2018). "Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review." *Oncotarget* **9**(27): 19415-19426.
- Santos, A. F., P. M. H. Mendonça, L. d. A. Santos, N. F. Silva and J. K. L. Tavares (2006). "Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE)." *Psicologia em Estudo* **11**: 371-380.

- Schanzer, W. (1996). "Metabolism of anabolic androgenic steroids." Clin Chem **42**(7): 1001-1020.
- Schiffer, L., W. Arlt and K. H. Storbeck (2018). "Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited." Mol Cell Endocrinol **465**: 4-26.
- Shahidi, N. T. (2001). "A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids." Clin Ther **23**(9): 1355-1390.
- Shokri, S., R. J. Aitken, M. Abdolvahabi, F. Abolhasani, F. M. Ghasemi, I. Kashani, S. Ejtemaieimehr, S. Ahmadian, B. Minaei, M. A. Naraghi and M. Barbarestani (2010). "Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells." Basic Clin Pharmacol Toxicol **106**(4): 324-330.
- Shokri, S., M. Hemadi, G. Bayat, M. Bahmanzadeh, I. Jafari-Anarkooli and B. Mashkani (2014). "Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa." Andrologia **46**(2): 184-190.
- Silva, L. S. M. F. and R. L. d. M. Moreau (2003). "Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **39**: 327-333.
- Silva, P. R. P. d., R. Danielski and M. A. Czepielewski (2002). "Esteróides anabolizantes no esporte." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **8**: 235-243.
- Silva, P. R. P. d., L. C. Machado Júnior, V. C. Figueiredo, A. P. Cioffi, M. C. Prestes and M. A. Czepielewski (2007). "Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **51**: 104-110.
- Silva, P. R. P. d., G. A. Maranhao Neto, V. C. Figueiredo, A. M. P. V. d. Santos, M. H. V. M. Jacob, E. H. d. Rose and L. P. d. Costa (2017). "DOPING SURVEY IN THE YOUTH SCHOOL GAMES IN BRAZIL." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **23**: 436-440.
- Sjoqvist, F., M. Garle and A. Rane (2008). "Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society." Lancet **371**(9627): 1872-1882.
- Snyder, P. J. (1984). "Clinical use of androgens." Annu Rev Med **35**: 207-217.
- Takahashi, M., Y. Tatsugi and T. Kohno (2004). "Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats." Endocr J **51**(4): 425-434.
- Tofighi, A., S. Ahmadi, S. M. Seyyedi, A. Shirpoor, F. Kheradmand and F. H. Gharalari (2018). "Nandrolone administration with or without strenuous exercise promotes overexpression of nephrin and podocin genes and induces structural and functional alterations in the kidneys of rats." Toxicol Lett **282**: 147-153.
- Tsitsimpikou, C., N. Chrisostomou, P. Papalexis, K. Tsarouhas, A. Tsatsakis and A. Jamurtas (2011). "The use of nutritional supplements among recreational athletes in Athens, Greece." Int J Sport Nutr Exerc Metab **21**(5): 377-384.
- Tyl, R. W. (2002). "In vivo models for male reproductive toxicology." Curr Protoc Toxicol **Chapter 16**: Unit16.11.
- Vargas, R. A., L. P. Oliveira, S. Frankenfeld, D. B. Souza, W. S. Costa, L. A. Favorito and F. J. Sampaio (2013). "The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats." Int Braz J Urol **39**(5): 675-682.
- Wilson, J. D. (1988). "Androgen abuse by athletes." Endocr Rev **9**(2): 181-199.
- Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (1995). "Anabolic-androgenic steroids. Current issues." Sports Med **19**(5): 326-340.
- Zahmatkesh, E., G. Najafi, V. Nejati and R. Heidari (2014). "Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone." Avicenna J Phytomed **4**(1): 43-52.

Zhang, Q.-S., E. Benedetti, M. Deater, K. Schubert, A. Major, C. Pelz, S. Impey, L. Marquez-Loza, R K. Rathbun, S. Kato, Grover C. Bagby and M. Grompe (2015). "Oxymetholone Therapy of Fanconi Anemia Suppresses Osteopontin Transcription and Induces Hematopoietic Stem Cell Cycling." Stem Cell Reports **4**(1): 90-102.

Zirkin, B. R. and V. Papadopoulos (2018). "Leydig cells: formation, function, and regulation†." Biology of Reproduction **99**(1): 101-111.

Sites da internet:

<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-sperm-cell-vector-image84822770>

Capítulo I

“Reproductive Toxicologic Evaluation of Oxymetholone Treated Male Rats”

Trabalho submetido à publicação na revista
“Archives of Toxicology”.

Toxicological Reproductive Evaluation of Oxymetholone Treated Male Rats

Deus Junior RS^{1,2}, Figueiredo TM³, Rosa JL³, LeiteGAA³, Dolder MAH¹

¹University of Campinas – UNICAMP, Institute of Biology, Campinas, São Paulo, Brazil

²Federal University of Grande Dourados – UFGD, Faculty of Health Sciences, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

³São Paulo State University - UNESP, Institute of Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: juniormsbrasil@hotmail.com; +55 67 996009795; <https://orcid.org/0000-0002-8551-1787>

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Ramão Souza de Deus Junior, Thamiris Moreira Figueiredo, Josiane de Lima Rosa, Gabriel Adan Araújo Leite, and Mary Anne Heidi Dolder. The first draft of the manuscript was written by Ramão Souza de Deus Junior and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

The use of anabolic-androgenic steroids (AAS) is on the rise and the clinical use of these substances is very important. Although these medications cause several side effects, their use is increasing among athletes and amateurs. The oxymetholone (OXY) is among the most used AAS because it can be taken orally, even though it can be hepatotoxic, as has been assessed in studies. **Objective:** The present study aimed to evaluate the reproductive toxicology of OXY in male *Wistar* rats as well as the possible reversibility of alterations after a rest period. **Methods:** In this study was used 52 male rats and 30 female rats. In the first experiment, 31 male rats and 30 female rats were employed. 21 male rats were divided into 3 groups (n=7): control group (CO) treated with saline solution; rats treated with 5mg/kg of OXY (O5); and rats treated with 10mg/kg of OXY (O10). Groups O5 e O10 were treated with OXY diluted in saline solution. After 40 days, animals were euthanized their body and reproductive organs were weighed and analyzed, Sperm quality and hormonal measurements were also evaluated. Moreover, 10 male rats and 30 female rats were used for an intrauterine artificial insemination technique. In a second experiment, 21 male rats were divided into the same three groups as in the first experiment and were treated for 40 days and rested for an extra 70 days. They were then tested for reversibility. **Results:** Experiment 1: Only the seminal gland with fluid in both experimental groups and the seminal gland without fluid in O5 had reduced weight. FSH, LH and intratesticular testosterone demonstrated lower levels for the treated animals. A lower sperm number was observed in the group exposed to the highest dose of OXY. Also, in O10 there was an increase of immobile spermatozoa. In Experiment 2 (reversibility) the circulating hormone level of progesterone was reduced. The O10 group has shown to have a decreased spermatid count in the testis as well as in daily sperm production. In the epididymis there was a reduction in the number of gametes in O10. **Conclusion:** The results present some evidence that the use of oxymetholone impairs sperm quality and that the use of this AAS can

unbalance the levels of hormones analyzed and other deleterious effects diminished 70 days after the end of the treatment.

Keywords: Toxicology, anabolic-androgenic steroids, testicles, hormones, male reproduction

INTRODUCTION

Synthetic hormones derived from testosterone are known as androgenic-anabolic steroids (AASs) (Carlini, 2007, Kim and Wood, 2014). They assist in the clinical treatment of various diseases such as anemia, debilitating diseases, cachexia, HIV carriers, some cancers, osteoporosis and hypogonadism (Snyder, 1984, Haupt, 1993). The users of AAS seem unaware or do not care about the various side effects caused by the indiscriminate use of this type of medication, ranging from gynecomastia, acne, masculinization (in women), to liver cancer (Yesalis and Bahrke, 1995, Evans, 2004, Shokri, Hemadi et al., 2014).

Oxymetholone is a synthetic hormone most commonly used in the treatment of aplastic anemias due to its property of hematopoiesis stimulation that can increase red blood cell counts by 50 to 70% in patients with this type of anemia (Zahmatkesh, Najafi et al., 2014, Zhang, Benedetti et al., 2015). It is one of the most frequently used AAS since it is taken orally and is common among the younger trainees who are the most fearful of intramuscular injections (Silva, Danielski et al., 2002, Silva and Moreau, 2003).

The use of anabolic agents in Brazil is restricted and is only authorized by medical prescription. However it can be obtained, considering the ease of marketing in bordering countries, such as Paraguay, for example, where the trade of this type of medication does not have appropriate control, and even by some Brazilian pharmacies which manage to corrupt the inspection that should limit the use of the AAS, permitting the purchase of illegal steroids (Ames and Souza, 2012, Moraes, 2015).

Brazilian studies with epidemiological data on anabolic consumption are scarce; however, regional research indicates that at least 2% of school-age students have already used anabolic steroids, while in the United States of

America, the value reported in scientific studies, is around 3% of youths (Evans, 2004, Iriart, Chaves et al., 2009, Venâncio, Nóbrega et al., 2010).

Experimental research is widely used in toxicological evaluation studies. However, when it comes to anabolic substances and male reproduction, literature is scarce (Ahmed, 2015). For oxymetholone, animal studies to assess reproductive toxicity are very rare. What can be found are old studies with humans, and these reveal that high doses of oxymetholone for long periods of time may cause a decrease in circulating testosterone and hypothalamic gonadotrophins, besides causing hepatic abnormalities resulting in liver tumors (Harkness, Kilshaw et al., 1975, Sweeney and Evans, 1976).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact on reproduction, as well as sperm quality and fertility of males treated with oxymetholone over a period of 40 days and to test the possible reversibility of the same treatment period after a 70 day rest, taking into account the time necessary to complete the spermatogenic cycle and the transit of the gametes through the epididymis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

52 male and 30 female *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*), 45 days old, were provided by the Central Biotherium at the State University of São Paulo (UNESP), Botucatu/SP and maintained in the Small Mammal Biotherium of the Department of Morphology at the Institute of Biosciences, Botucatu/SP. They were acclimated for 30 days before beginning the experiment. Animals were maintained in polypropylene cages (43cm x 30cm x 15cm) with autoclaved grade pine shavings as bedding. They were maintained under controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and lighting conditions (12-h light/dark cycle). Commercial ration and water were distributed *ad libitum*. The experiment protocol followed the Ethical Principles in Animal Research of the Committee for Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA) of UNESP, Botucatu/SP (protocol number 938).

Experiment 1

21 male rats, 75 days old and weighing 250g were divided into 3 groups (n=7): CO, control group receiving saline solution (vehicle) and the groups O5 and O10 treated with OXY diluted in saline solution, 5mg/kg and 10mg/kg respectively. Rats were treated daily by gavage for a period of 40 days.

10 male rats were not treated but remained in the same conditions as the other rats of this experiment. They were, subsequently, vasectomized to induce the 30 female rats for the intrauterine artificial insemination technique. The females were housed separately for 2 weeks before the experiment. This room had a reversed light/dark cycle.

Experiment 2

21 male rats were used to repeat the first experiment during 40 days, after which they remained 70 days without treatment (rest) to test the possibility of reversibility of the alterations observed in the first experiment.

Euthanasia and sample destination

At the end of the treatment, animals were euthanized in a CO₂ chamber, followed by cardiac puncture. Whole blood was stored in serum collection tubes, centrifuged, for later hormonal measurement.

The cauda region of the left epididymis was removed for the collection of spermatozoa for the artificial insemination technique *in utero*, for sperm morphology and then frozen at -20°C for determination of sperm count and sperm transit time, together with the caput/corpus region of the left epididymis. The left testicle of each rat was removed and weighed with a precision analytical balance, decapsulated, centrifuged to obtain testicular fluid to determine the production of intratesticular testosterone and subsequently frozen at -20°C to determine the number of germ cells; the right testis and epididymis were used for histopathological, morphometric data and determination of the dynamics of the spermatogenic kinetics.

Collection of organs for histology, morphometry and dynamics of the spermatogenic cycle

The right testis was removed had the tunica albuginea sectioned at the poles, then was immersed in Bouin fixative solution, as described by Russell et al. (1993); the epididymis was also removed and immersed in Bouin. These organs were subsequently processed for inclusion in Paraplast and cut to a thickness of 5µm. The sections were stained with hematoxylin and eosin for histopathological and morphometric analyses (Russell, Ettlín et al., 1993).

Histopathology of the testes

The histopathological examination was performed by analyzing 100 sections of the seminiferous tubules, observing the epithelium, the lumen content and interstitium of the testicles and epididymis, so that possible morphological lesions of these organs could be classified according to specific guidelines for toxicological studies (Foley, 2001).

The tubules were considered abnormal in the presence of acidophilic cells, multinucleated cells, retained spermatids, cell type degeneration, vacuolation of the epithelium or exfoliation of cells in the lumen. The aspect of the testicular interstitium was also quantitatively evaluated.

Morphometry of the testis

To evaluate the seminiferous tubule diameter and the germinative epithelium thickness, ten sections of seminiferous tubules were examined per animal from the control group and from the groups treated with anabolic steroid, counting the cells in stage IX of spermatogenesis, when stage 19 spermatids were already released from the germinal epithelium. For this purpose, a Leica DMLB microscope, 200X magnification and a Leica Q-win software Version 3 for Windows™ image analyzer was used.

Spermatogenesis dynamics

In order to evaluate the dynamics of the spermatogenic process, the relative frequency of the stages were estimated: I-VI (presence of two generations of spermatids), VII-VIII (recognized by mature spermatids located at the edge of the

lumen), IX-XIII (shows only one generation of spermatids), XIV (identified by secondary spermatocytes) in 100 cross sections of seminiferous tubules per animal, selecting the most regular and circular tubule sections. The relative frequency of the stages determined the rhythm or duration of the spermatogenic process.

Hormone measurements of testosterone, progesterone, FSH and LH and intratesticular testosterone

Blood obtained by cardiac puncture was collected in a conical tube and then centrifuged at 700 G for 20 minutes at 4°C, for serum separation, which was frozen until employed in the hormonal tests (testosterone, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone) and the testicular fluid obtained previously (intratesticular testosterone) were performed by the double antibody radioimmunoassay technique at the Laboratory of Neuroendocrinology of the College of Dentistry of Ribeirão Preto, USP.

Calculation of daily sperm production by testis and counting the number and transit time of spermatozoa in the epididymis

The right testicles, decapsulated and centrifuged, were frozen until homogenized according to the method described by Robb et al. (1978) with the following adaptations: the testicular parenchyma was defrosted and homogenized in a mixture of NaCl (9g), Triton X100 (0.5ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in two intervals of 15s, separated by a 30-second interval on ice, then passed through a sonicator for 30 seconds. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (5 fields per animal) and mature spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of spermatids in stage 19 was divided by 6.1, which is the number of days of the cycle, during which these spermatids are present in the seminiferous epithelium. Similarly, the caput/corpus and cauda of the epididymis were cut into small fragments with scissors and homogenized following the same protocol for the testis. The transit time of the sperm through the epididymis was determined by dividing the number of spermatozoa in each portion by the DSP.

Sperm Motility

Sperm from epididymal cauda was diluted in the HTF medium (human tubal fluid) and used to assess sperm motility and then, for *in utero* artificial insemination procedure. For this purpose, a 10 μ L aliquot was placed in a Makler chamber (Irvine, Israel) and analyzed under light microscopy, 400 X magnification. A total of 100 spermatozoa per animal were evaluated, classified according to their motility as: Type A: motile, with progressive motility; type B: motile, with non-progressive motility; type C: immotile.

Spermatic morphology

Spermatozoa were obtained from the same solution used for the artificial insemination procedure *in utero*. For this, 100 μ L of the sperm solution was transferred to 900 μ L of 10% formalin-saline solution. Smears were then made on histological slides, which were allowed to air dry for 90 minutes and then observed with a phase contrast microscope (magnification of 400x) (Seed, Chapin et al., 1996). 200 sperm were analyzed per animal and the morphological abnormalities found were classified into two categories: a) head abnormalities (without characteristic curvature, pin-shaped, without curvature, isolated); b) cauda abnormality (coiled, broken, folded, isolated) (Filler, 1993).

Artificial intrauterine insemination (AI) and fertility assessment

Females with pro-estrus induced 115 hours before the experiment (n=30), were paired with males having sexual experience, previously vasectomized by vas deferens cauterization. Females were used (n=10) with the intention of cleaning the spermatic ducts by coitus with the vasectomized rats. Then, the females receptive to the vasectomized rats were selected for the artificial insemination technique *in utero*. Male rats from the treated and control groups were placed in isolation and subjected to the sperm insemination procedure, as described by Klinefelter et al., (1994) and Kempinas et al., (1998). Briefly, sperm were obtained from the proximal cauda of the epididymis and transferred to 2 mL of HTF (Human Tubal Fluid) at 34°C. After a 10-fold dilution, the spermatozoa

were counted in a Neubauer's chamber and a volume containing 5×10^6 spermatozoa was injected in each uterine horn (Klinefelter, Laskey et al., 1994, Kempinas, Suarez et al., 1998). When insemination with the sperm of one male was completed, the abdominal musculature was sutured. Twenty days later, the artificially inseminated females were sacrificed by narcosis in a CO₂ chamber followed by decapitation, to allow assessment and calculation of fertility and reproductive performance parameters. After collection of the uterus and ovaries the numbers of corpora lutea, implants and resorptions were determined. From these results, the following parameters were calculated: fertility potential (implantation efficiency): $\text{implantation sites} / \text{corpora lutea} \times 100$, pre-implantation loss rate: $(\text{number of corpora lutea} - \text{number of implants} / \text{number of corpora lutea}) \times 100$, and post-implantation loss rate: $(\text{number of implants} - \text{number of live fetuses}) / \text{number of implants} \times 100$.

The AI was not performed in the second experiment, taking into account the negative results obtained with this technique and the 3 Rs policy: Reduce, recycle and reuse.

Statistical analysis

The results from different parameters among the experimental groups were compared using ANOVA or Kruskal-Wallis with *posteriori* by Tukey or Dunnet test, respectively, according with the characteristics of each variable. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed on GraphPAd Prism (6.00).

RESULTS

Animals were weighed and then sacrificed; the reproductive organs were weighed on a precision scale. Thus, it was observed that the final body weight results were similar for all groups.

Reproductive organs had similar weights in all groups, except for the full seminal vesicle in both groups. When analyzing the relative weights of the

seminal vesicle, statistically significant difference was found in both groups with the fluid-filled organ and in the empty organ in O5 (Table 1).

Results referring to the evaluation of the hormonal dosage show significant reductions in the dosage of LH, FSH and intratesticular testosterone, highlighting the first two hormones with $p \leq 0.001$ (Figure 1).

In the testicular sperm count groups are in accordance considering the values obtained (Table 2). In the epididymal sperm count, a significant reduction of spermatozoa in the caput/corpus count was expressed in the group treated with the highest dose (Table 2).

For sperm motility (Figure 2), which is an important factor to evaluate sperm quality, there was a decrease in spermatozoa type A (motile, with progressive movement) in group O10. On the other hand, gametes type B (motile, without progressive movement) had homogeneous medians between the groups while type C (immotile) presented a statistically relevant increase in rats treated with the highest dose compared to the controls.

In sperm morphology, the numbers obtained showed symmetry of values in the percentages of normal spermatozoa and in the head and cauda abnormalities, as well as in the occurrence of a cytoplasmic droplet (Table 3).

Table 4 presents the results of laparotomy after artificial insemination *in utero* and the results obtained did not reveal differences in the parameters evaluated between treated animal groups and control group.

Results obtained by the histopathological evaluation, spermatogenic dynamics and morphometry of the seminiferous tubes are shown in table 5 and, as can be observed, there was only a significant increase in the O5 group in relation to the control when the number of normal seminiferous tubules was analyzed, without cellular alterations statistically significant (Figure 3). In the morphometric analysis of the seminiferous tubules and dynamic spermatogenesis there were no statistically significant differences.

The second experiment aimed to examine possible changes in the reversibility after treatment with oxymetholone.

In table 6 it is possible to analyze body and organ weight after treatment and rest for 70 days without the use of the medication and all organs connected

to reproduction were observed to have homogeneous results when compared to the control group.

In the hormonal concentration, reversibility showed that different from the first treatment, there was a significant reduction of the progesterone levels in both treatments, whereas in the other hormones, the results obtained demonstrate small discrepancies, with no statistical significance (Figure 4).

In the testicular sperm count, the results demonstrate statistically significant decreases in the number of mature spermatids and DPS in the group treated with the highest dose, but these differences were not repeated when the testis weight was taken into account, as can be seen in Table 7. In the same table, considering the epididymal count, a reduction in the number of spermatozoa was evident in the caput/corpus epididymis region, with considerable statistical significance.

Analysis of spermatic motility in the reversibility experiment, shown in Figure 5, shows that the values obtained were not different between types A and B spermatozoa in either dosage tested, but in type C, a subtle increase can be noted when compared with the control group, although this group was not statistically different.

In histopathological evaluations, spermatogenic dynamics and morphometry of the seminiferous tubules, no statistically significant changes were observed, as shown in table 8.

DISCUSSION

Oxymetholone is an oral AAS and is considered very dangerous because of its high hepatotoxicity and its association with the appearance of liver tumors (1999). However, reproductive toxicity needs to be further investigated because of the lack of studies for this purpose. This study was the first study to describe the reversibility evaluation of the deleterious effects caused by the use of this medication.

In order to evaluate reproductive toxicity, a parameter of great importance that needs to be investigated is the final body weights and the reproductive organs weights, so that any changes could be better understood (Clegg, 2001, Tyl, 2002). In the present study, however, did not find differences between the final weights of treated animals, which corroborates the work of Clark & Harrold

(1997). Only the relative and absolute weights of the full seminal vesicles in both groups and the relative weight of the empty vesicle were smaller when compared to the control group. This fact could be explained the use of OXY can impair the function of this gland causing the seminal gland to produce secretion unregulated (Noda and Ikawa, 2019). However, after the reversibility experiment, the weights of these organs normalized, similar to the control group.

LH, FSH and intratesticular testosterone levels decreased, and it is important to note that the statistical significance of the reduction of levels of LH and intratesticular testosterone presented decreases with a value of $p \leq 0.001$, which may indicate that oxymetholone acts deregulating the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, but the level of serum testosterone was not been reduced due to the availability of exogenous synthetic hormone (Drobnis and Nangia, 2017). In contrast, after reversibility, the hormonal levels of circulating and intratesticular testosterone and hypothalamic gonadotrophins remained similar to the control group; however, another steroid hormone, named progesterone, was deregulated in the exposed groups. Progesterone molecule is the precursor of testosterone molecule, and thus, with the elimination of treatment with synthetic steroids, endogenous testosterone levels were normalized and a greater number of progesterone molecules were required for this purpose, leading to a decrease in the availability of this hormone (Matzkin, Yamashita et al., 2013).

After analysis of the results, the testicular sperm count was not lower in the animals treated with Oximetolone. However, in the epididymal sperm count, at the higher dosage, O10, a decrease in the number of spermatozoa was observed for this organ, which could have been caused by the decrease in the sperm transit time or possible involuntary ejaculation. Also, the reduction of sperm transit through the epididymis could cause increased difficulties of motility, morphological alterations and immature spermatozoa (Fernandez, Porto et al., 2008), but sperm transit was not altered in OXY treated rats in this first experiment, and the results found were similar to the findings of Zahmatkesh *et al.*, (2014). On the other hand, in the second experiment, we found a reduction of mature spermatids in the testis and lower DSP for the highest dose, as well as a lower number of spermatozoa in the head of the epididymis.

Despite the previous results, data obtained with sperm morphology showed that there was no difference between normal sperm count (head and cauda

abnormalities) and the presence of a cytoplasmic droplet in animals treated with oxymetholone. Therefore, the delayed motility in the higher dose group is not correlated with morphological defects (Ban, Komatsu et al., 1995). As several anabolic steroids cause reduction of gonadotrophic hormones, and it was not different with oxymetholone, it is possible that there is a decrease in sperm motility and maturity, since these hormones are related to sperm development (Zahmatkesh, Najafi et al., 2014, Zahmatkesh, Najafi et al., 2015). However, this study only found reduced sperm motility. Furthermore, the second experiment that evaluated the reversibility of deleterious effects of this medication showed that both morphology and sperm motility did not present changes when compared to the control group, after 70 days without treatment.

The fertility test after artificial intrauterine insemination, an important parameter of sperm fertilization conditions and correlated with the morphological and motor abilities of male gametes (Fernandez, Fernandes et al., 2017), demonstrated no difference between the treated and the control groups. This was investigated because an *in vitro* study has shown that oxymetholone may cause a significant reduction in fertilization rate (Zahmatkesh, Najafi et al., 2015).

According to several studies, the histopathological analyses revealed problems in spermatozoa production caused by the lack of testosterone, which is generally linked to problems in Leydig cells, or disorders linked to Sertoli cells, considered the cells responsible for nourishing, supporting and phagocytizing degenerating cells during spermatogenesis (O'Shaughnessy, Morris et al., 2009, Campion, Catlin et al., 2012, Oda and El-Ashmawy, 2012). However, in the present study no increase in the number of acidophilic cells and vacuolations were observed; this is noteworthy since their occurrence might have indicated cell death of germ cells.

The seminiferous tubules are where spermatogenesis occur. Changes in both diameter and height of the germinal epithelium could indicate possible toxicological actions in seminiferous tubules, causing reproductive impairment for male genital system. Also correlated with the seminiferous tubules, the compromised spermatogenesis can be indicated with changes in spermatogenesis kinetics, which may also justify deficiencies in the spermatid structures (Hess and Renato de Franca, 2008, Creasy, Bube et al., 2012, Keihani, Martin et al., 2018).

However, our results do not demonstrate alterations in morphology and in spermatogenesis kinetics for oxymetholone treated rats in both experiments. This corroborates with the similar measurements of testicle weights found for all groups, since changes in the structure of the seminiferous tubules could cause alterations in organ weights. The findings differ from those of Cunningham & Huckins (1979), that reported diminished tubule diameters and testis weight, in rats treated with another synthetic steroid, testosterone propionate, which is another type of AAS.

CONCLUSION

In summary, the results showed that oxymetholone impaired sperm quality, male reproductive system, and deregulate the hypothalamic-pituitary-gonadal axis after the period of exposure to the drug, however; the recovering time was important to attenuate the reproductive adverse effects provoked by the exposure to the oxymetholone in the male rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to José Eduardo Bozano, from UNESP, Botucatu/SP, for his excellent technical assistance, to Dr. Ruither de Oliveira Gomes Carolino and Dr. Janete Aparecida Anselmo Franci, from USP, Ribeirão Preto/SP, for the hormonal measurements contributions. Finally, the authors are grateful to Federal University of Grande Dourados – UFGD and São Paulo State University (UNESP), for the collaboration and assistance throughout the project.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

REFERENCES

- (1999). "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxymetholone (CAS NO. 434-07-1) in F344/N Rats and Toxicology Studies of Oxymetholone in B6C3F1 Mice (Gavage Studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **485**: 1-233.
- Ahmed, M. A. (2015). "Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway." Toxicol Appl Pharmacol **282**(3): 285-296.

- Ames, J. and D. Z. Souza (2012). "Counterfeiting of drugs in Brazil." Rev Saude Publica **46**(1): 154-159.
- Ban, Y., T. Komatsu, M. Kemi, S. Inagaki, T. Nakatsuka and H. Matsumoto (1995). "Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats." Exp Anim **44**(4): 315-322.
- Campion, S., N. Catlin, N. Heger, E. V. McDonnell, S. E. Pacheco, C. Saffarini, M. A. Sandrof and K. Boekelheide (2012). "Male reprotoxicity and endocrine disruption." Exp Suppl **101**: 315-360.
- Carlini, E. A. G., J.C.; Noto, A.R.; Carlini, C.M.; Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. (2007). "II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005." Páginas & Letras **01**: 472.
- Clark, A. S., E. V. Harrold and A. S. Fast (1997). "Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats." Horm Behav **31**(1): 35-46.
- Clegg, E. D., Perreault, S. D., & Klinefelter, G. R. (2001). "Assessment of male reproductive toxicology." Principles and Methods of Toxicology: 1263-1299.
- Creasy, D., A. Bube, E. de Rijk, H. Kandori, M. Kuwahara, R. Masson, T. Nolte, R. Reams, K. Regan, S. Rehm, P. Rogerson and K. Whitney (2012). "Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system." Toxicol Pathol **40**(6 Suppl): 40s-121s.
- Cunningham, G. R. and C. Huckins (1979). "Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone." Endocrinology **105**(1): 177-186.
- Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Exogenous Androgens and Male Reproduction." Adv Exp Med Biol **1034**: 25-28.
- Evans, N. A. (2004). "Current concepts in anabolic-androgenic steroids." Am J Sports Med **32**(2): 534-542.
- Fernandez, C. D., G. S. Fernandes, A. P. Favareto, J. E. Perobelli, M. Sanabria and W. D. Kempinas (2017). "Decreased Implantation Number After In Utero Artificial Insemination Can Reflect an Impairment of Fertility in Adult Male Rats After Exogenous Leptin Exposure." Reprod Sci **24**(2): 234-241.
- Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." Int J Androl **31**(4): 427-437.
- Filler, R. (1993). Male reproductive toxicology.
- Foley, G. L. (2001). "Overview of male reproductive pathology." Toxicol Pathol **29**(1): 49-63.
- Harkness, R. A., B. H. Kilshaw and B. M. Hobson (1975). "Effects of large doses of anabolic steroids." British journal of sports medicine **9**(2): 70-73.
- Haupt, H. A. (1993). "Anabolic steroids and growth hormone." Am J Sports Med **21**(3): 468-474.
- Hess, R. A. and L. Renato de Franca (2008). "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium." Adv Exp Med Biol **636**: 1-15.
- Iriart, J. A., J. C. Chaves and R. G. Orleans (2009). "[Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders]." Cad Saude Publica **25**(4): 773-782.
- Keihani, S., C. Martin, J. R. Craig, C. Zhang, A. P. Presson, J. B. Myers, K. I. Aston, B. R. Emery, D. T. Carrell and J. M. Hotaling (2018). "Semen parameters are unaffected by statin use in men evaluated for infertility." Andrologia **50**(5): e12995.

- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman and G. R. Klinefelter (1998). "Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 890-896.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. F. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman, M. G. Narotsky, S. D. Perreault, D. P. Evenson, D. D. Ricker and G. R. Klinefelter (1998). "Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 897-904.
- Kim, J. Y. and R. I. Wood (2014). "Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats." Horm Behav **66**(4): 585-590.
- Klinefelter, G. R., J. W. Laskey, S. D. Perreault, J. Ferrell, S. Jeffay, J. Suarez and N. Roberts (1994). "The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis." J Androl **15**(4): 318-327.
- Matzkin, M. E., S. Yamashita and M. Ascoli (2013). "The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells." Mol Cell Endocrinol **370**(1-2): 130-137.
- Moraes, T. P. B. (2015). "Anabolizantes nas buscas da WEB. Um estudo sobre o interesse sazonal por esteroides no Brasil." RJLB: 1979-2007.
- Noda, T. and M. Ikawa (2019). "Physiological function of seminal vesicle secretions on male fecundity." **18**(3): 241-246.
- O'Shaughnessy, P. J., I. D. Morris, I. Huhtaniemi, P. J. Baker and M. H. Abel (2009). "Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice." Mol Cell Endocrinol **306**(1-2): 2-8.
- Oda, S. S. and I. M. El-Ashmawy (2012). "Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits." Int J Exp Pathol **93**(3): 172-178.
- Robb, G. W., R. P. Amann and G. J. Killian (1978). "Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats." J Reprod Fertil **54**(1): 103-107.
- Russell, L. D., R. A. Ettl, A. P. S. Hikim and E. D. Clegg (1993). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." International Journal of Andrology **16**(1): 83-83.
- Seed, J., R. E. Chapin, E. D. Clegg, L. A. Dostal, R. H. Foote, M. E. Hurtt, G. R. Klinefelter, S. L. Makris, S. D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K. A. Treinen, D. N. Veeramachaneni and L. D. Wise (1996). "Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation." Reprod Toxicol **10**(3): 237-244.
- Shokri, S., M. Hemadi, G. Bayat, M. Bahmanzadeh, I. Jafari-Anarkooli and B. Mashkani (2014). "Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa." Andrologia **46**(2): 184-190.
- Silva, L. S. M. F. and R. L. d. M. Moreau (2003). "Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **39**: 327-333.
- Silva, P. R. P. d., R. Danielski and M. A. Czepielewski (2002). "Esteróides anabolizantes no esporte." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **8**: 235-243.
- Snyder, P. J. (1984). "Clinical use of androgens." Annu Rev Med **35**: 207-217.

- Sweeney, E. C. and D. J. Evans (1976). "Hepatic lesions in patients treated with synthetic anabolic steroids." Journal of clinical pathology **29**(7): 626-633.
- Tyl, R. W. (2002). "In vivo models for male reproductive toxicology." Curr Protoc Toxicol **Chapter 16**: Unit16.11.
- Venâncio, D. P., A. C. L. d. Nóbrega, S. Tufik and M. T. d. Mello (2010). "Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **16**: 191-195.
- Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (1995). "Anabolic-androgenic steroids. Current issues." Sports Med **19**(5): 326-340.
- Zahmatkesh, E., G. Najafi and V. Nejati (2015). "Protective Effect of Royal Jelly on In Vitro Fertilization (IVF) in Male Mice Treated with Oxymetholone." Cell J **17**(3): 569-575.
- Zahmatkesh, E., G. Najafi, V. Nejati and R. Heidari (2014). "Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone." Avicenna J Phytomed **4**(1): 43-52.
- Zhang, Q.-S., E. Benedetti, M. Deater, K. Schubert, A. Major, C. Pelz, S. Impey, L. Marquez-Loza, R. K. Rathbun, S. Kato, Grover C. Bagby and M. Grompe (2015). "Oxymetholone Therapy of Fanconi Anemia Suppresses Osteopontin Transcription and Induces Hematopoietic Stem Cell Cycling." Stem Cell Reports **4**(1): 90-102.

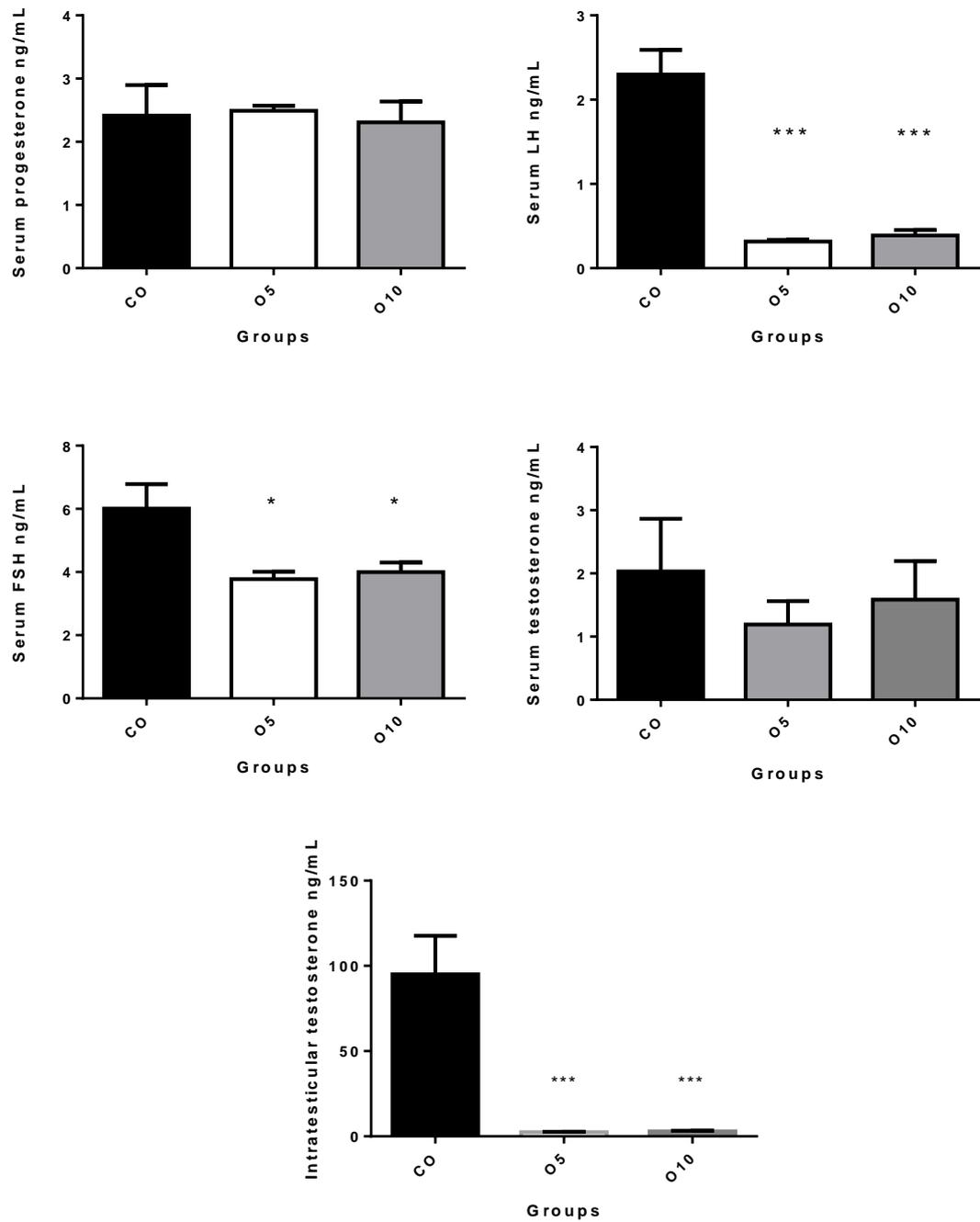


Figure 1- Hormonal serum concentrations. Test of variance analysis - ANOVA with Dunnet *a posteriori* test, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

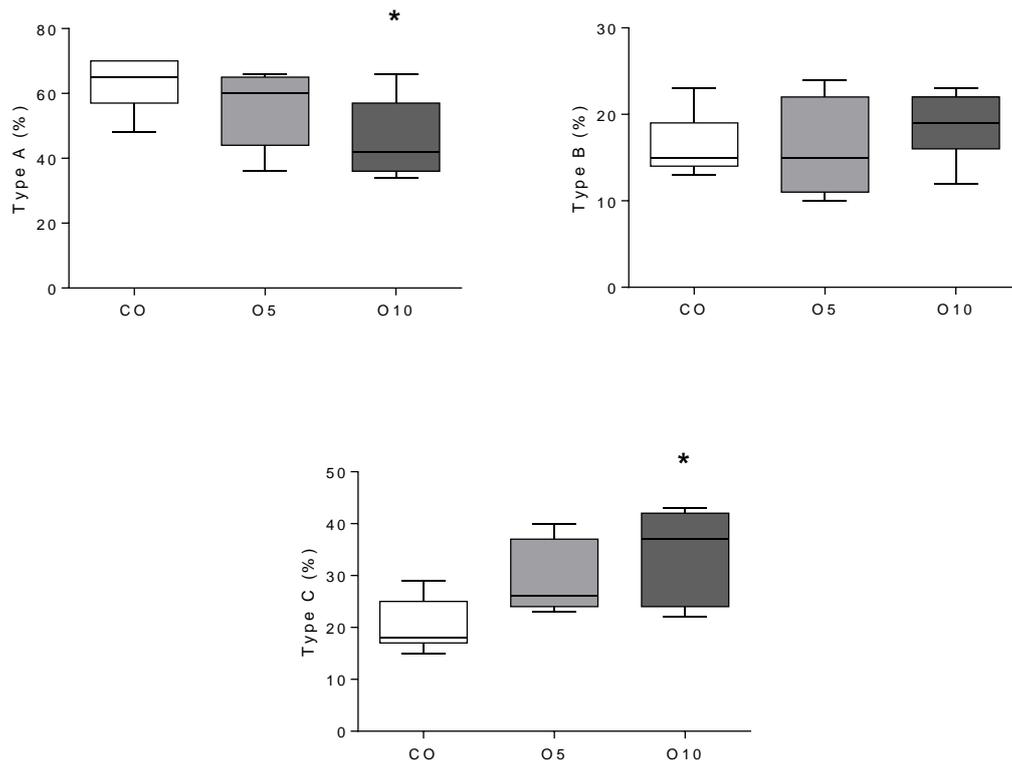


Figure 2. Sperm motility. Values expressed as median (1st quartile - 3rd quartile), $*p \leq 0.05$. Kruskal-Wallis test with Dunnet *a posteriori* test.

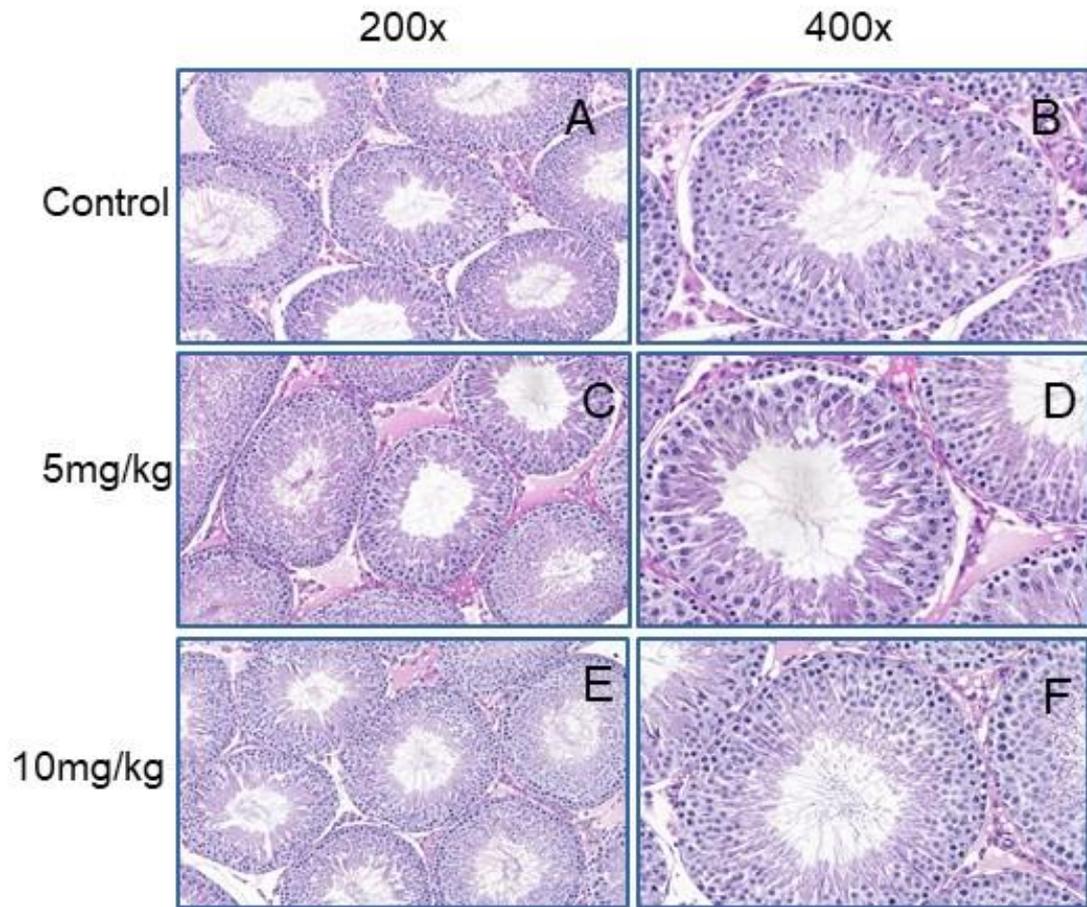


Figure 3. Photomicrographs of testicular sections from the experimental groups treated with oxymetholone (Experiment 1). Note that B is in stage XIV, while D is in stage IX-XIII and F is in stage I-VI.

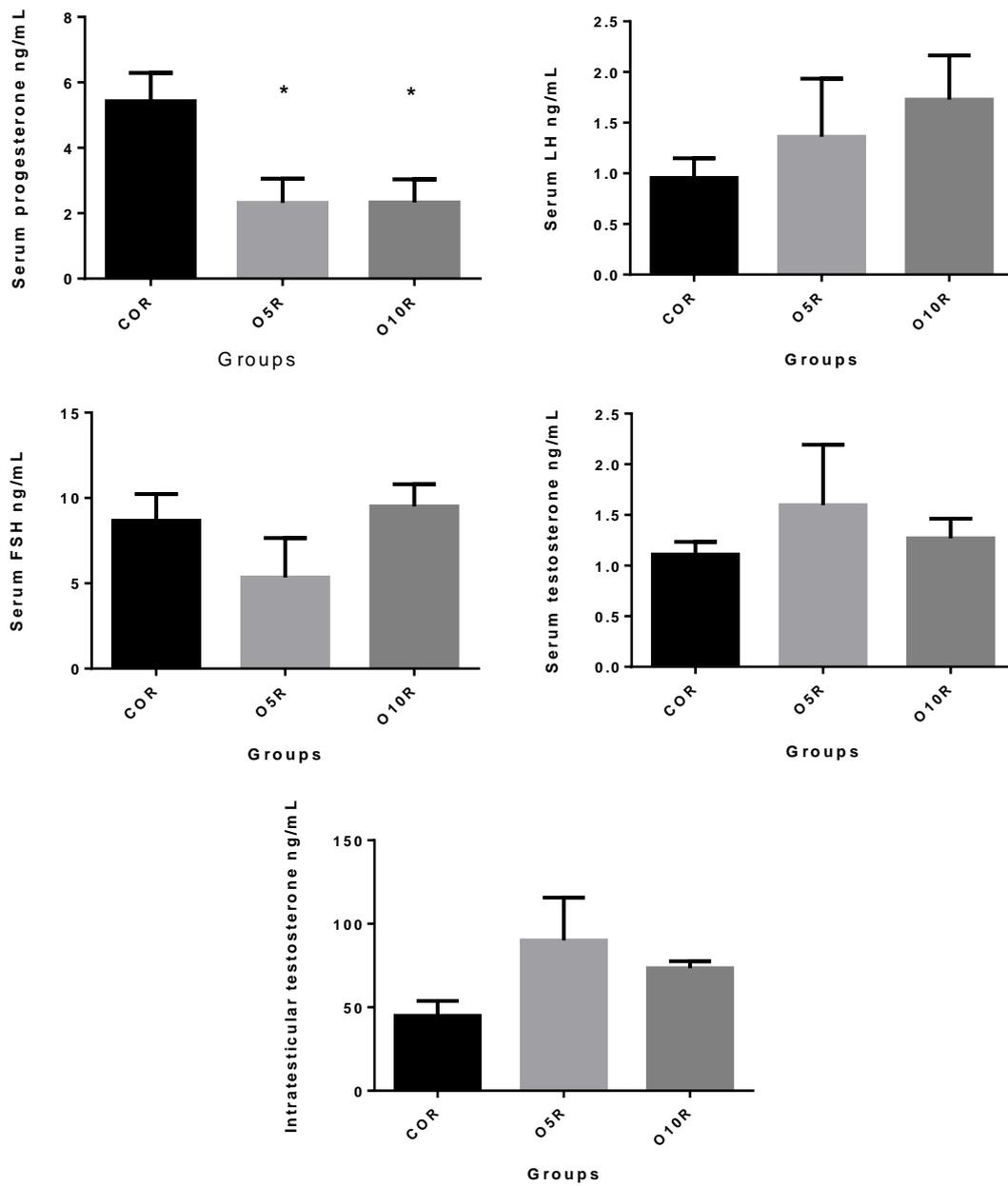


Figure 4 – Hormonal serum concentrations in the reversibility experiment. Variance analysis test- ANOVA with Dunnet a *posteriori* test * $p \leq 0.05$.

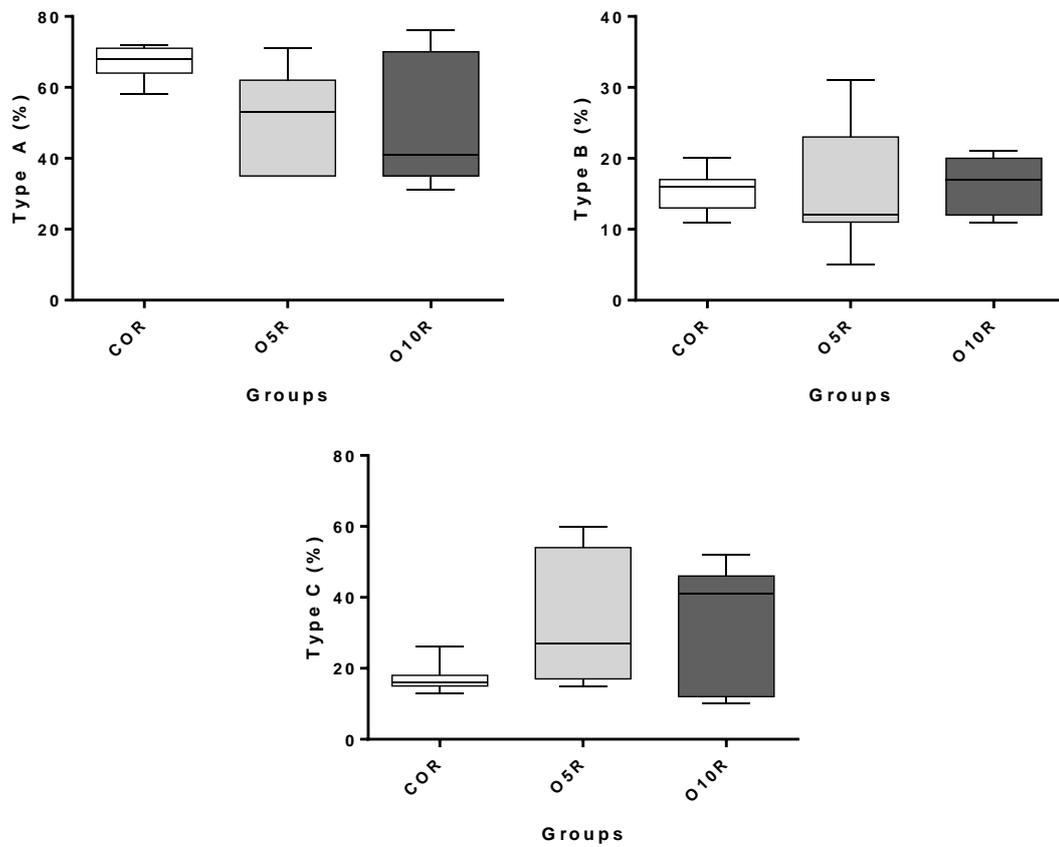


Figure 5 – Sperm motility of the reversibility experiment. Values expressed as median (1st quartile - 3rd quartile), $p \geq 0.05$. Kruskal-Wallis test with Dunnet *a posteriori* test.

Table 1. Final body weight and reproductive organ weight.

Parameters	CO	O5	O10
Final weight (g)	441.10±13.78	456.90±13.82	440.40±10.83
Ventral prostate (mg)	453.80±75.58	495.00±39.28	502.90±17.63
Relative ventral prostate (mg/100g)	102.20±16.60	108.00±7.00	114.50±4.39
Full seminal vesicle (g)	1.23±0.07	0.77±0.11*	0.75±0.12*
Full relative seminal vesicle (mg/100g)	279.00±13.54	169.10±23.96**	169.10±25.27**
Empty seminal vesicle (mg)	531.20±50.77	390.80±56.17	404.20±38.36
Empty seminal vesicle (mg/100g)	120.30±10,46	85.58±10.71*	91.26±7.28
Epididymis (mg)	668.20±10.79	653.60±24.08	609.30±20.00
Epididymis (mg/100g)	152.60±6.35	143.40±5.13	139.10±6.70
Testis (g)	1.75±0.04	1.81±0.05	1.71±0.06
Relative testis (mg/100g)	399.0±12.48	399.80±15.41	392.10±19.81

Values expressed as mean ± standard error of the mean, *p≤0.05, **p≤0.01. Test of variance analysis - ANOVA with Dunnet a posteriori test.

Table 2. Sperm count and sperm transit time.

Parameters	CO	O5	O10
<i>Testicular sperm count</i>			
Mature Spermatids (x10⁶/testis)	231.20±16.39	193.40±31.27	225.50±22.10
Mature Spermatids (x10⁶/g/testis)	158.60±10.46	106.00±23.01	157.10±14.51
Spermatid production (x10⁶/testis/ daily)	37.90±2.68	31.70±5.12	36.97±3.62
Spermatid production (x10⁶/testis/g/ daily)	26.00±1.71	17.38±3.77	25.75±2.37
<i>Epididymal sperm count</i>			
<i>Caput/corpus</i>			
Number of spermatozoa (x10⁶/organ)	148.70±8.81	123.00±11.97	97.31±10.99**
Sperm transit time (days)	4.13±0.51	4.81±1.10	2.76±0.37
<i>Cauda</i>			
N° of spermatozoa (x10⁶/organ)	211.60±10.69	134.80±26.24	153.60±28.04
Sperm transit time (days)	6.75±0.67	6.21±1.30	5.47±1.18

Values expressed as mean ± standard error of the mean, **p ≤ 0.01. Test of variance analysis - ANOVA with Dunnett a *posteriori* test.

Table 3. Spermatic morphology

Parameters	CO	O5	O10
Normal spermatozoa (%)	98.50 (98.50-99.0)	99.00 (97.00-99.50)	98.00 (98.00-99.50)
Abnormal spermatozoa (%)			
Head abnormality	1.00 (1.00-1.50)	0.50 (0.00-2.00)	0.50 (0.00-1.50)
Cauda abnormality	0.50 (0.00-0.50)	0.50 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.50)
Cytoplasmic droplet.	37.50(32.00-44.00)	45.00(40.00-60.00)	44.00(40.00-52.50)

Values expressed as median (1st quartile - 3rd quartile), $p \geq 0.05$. Kruskal-Wallis test with Dunnet a *posteriori* test.

Table 4. Fertility tests after artificial insemination *in utero*.

Parameters	CO	O5	O10
Fertile Potential (%)	77.30	68.30	64.86
Pregnancy rate (%)	81.78	71.42	85.71
Pre-implantation loss (%)	22.70	31.60	35.10
Post-implantation loss (%)	23.50	26.80	39.50

Values expressed as percentage (chi-square test), $p \geq 0.05$.

Table 5. Histopathological evaluation, spermatogenic dynamics and tubular morphometry in oxymetholone treated rats.

Parameters	CO	O5	O10
Normal seminiferous tubules (%)	75.00 (71.00 – 79.00)	82.00 (79.00 – 84.00)*	79.50 (75.25 – 84.75)
Seminiferous tubules with acidophilic cells (%)	20.00 (15.00 – 23.00)	13.00 (11.00 – 18.00)	16.50 (11.75 – 20.75)
Seminiferous tubules with vacuolization (%)	5.00 (4.00 – 7.00)	5.00 (2.00 -4.00)	4.00 (2.75 – 4.25)
Stages I-VI (%)	44.00 (42.00 – 45.00)	39.00 (37.00 – 41.00)	40.50 (39.00 – 44.25)
Stages VII-VIII (%)	15.00 (14.00 – 19.00)	17.00 (16.00 – 19.00)	18.00 (16.00 – 20.75)
Stages IX-XIII (%)	34.00 (33.00 – 36.00)	34.00 (34.00 – 36.00)	32.00 (31.00 – 36.00)
Stages XIV (%)	7.00 (6.00 – 8.00)	7.50 (5.00 – 10.00)	7.00 (5.75 – 10.00)
Height of the seminiferous epithelium (µm)	85.74±0.95	87.44±1.50	90.56±1.38
Tubular Diameter (µm)	280.50±3.80	287.00±5.70	282.20±5.40

Values expressed in median and interquartile ranges ¹ or means ± SEM ², p <0.05. One-way ANOVA followed by Tukey or Dunnet test, respectively.

Table 6. Final body weight and weight of reproductive organs in reversibility experiment.

Parameters	COR	O5R	O10R
Final Weight (g)	401.80±10.33	394.20±7.14	405.80±14.56
Ventral prostate (mg)	651.70±15.53	537.30±64.76	591.10±34.94
Relative ventral prostate (mg/100g)	130.30±30.92	109.20±11.86	121.00±9.98
Full seminal vesicle (g)	1.30±0.04	1.19±0.14	1.15±0.06
Full relative seminal vesicle (mg/100g)	258.60±9.84	244.00±24.49	234.40±14.49
Empty seminal vesicle (mg)	490.30±17.27	500.70±47.39	440.90±21.26
Empty seminal vesicle (mg/100g)	97.81±5.48	102.50±9.62	89.97±6.05
Epididymis (mg)	715.40±22.61	698.60±25.63	655.10±24.74
Epididymis (mg/100g)	142.00±4.62	143.40±5.71	133.80±8.29
Testis (g)	1.84±0.05	1.77±0.08	1,69±0.07
Relative Testis (mg/100g)	369.90±14.35	365.00±18.17	343.40±14.35

Values expressed as mean ± standard error of the mean, $p \geq 0.05$. Test of variance analysis - ANOVA with Dunnet a *posteriori* test.

Table 7. Sperm count and sperm transit time of the reversibility experiment.

Parameters	COR	O5R	O10R
<i>Testicular sperm count</i>			
Mature spermatids (x10⁶/testis)	284.40±18.86	280.30±18.97	211.50±40.71*
Relative mature spermatids (x10⁶/g/testis)	185.00±14.29	192.10±143.90	152.40±12.68
Sperm production (x10⁶/testis/ daily)	46.13±3.09	45.96±3.11	34.67±2.52*
Relative sperm production (x10⁶/testis/g/ daily)	30.33±2.34	31.49±2.44	24.99±2.07
<i>Epididymal sperm count</i>			
<i>Caput/corpus</i>			
Number of spermatozoa (x10⁶/organ)	173.10±13.84	138.00±13.59	129.20±10.05*
Sperm transit time (days)	3.75±0.16	3.02±0.28	3.77±0.24
<i>Cauda</i>			
N° of spermatozoa (x10⁶/organ)	353.40±18.28	356.80±38.13	266.70±19.90
Sperm transit time (days)	7.97±0.88	7.91±0.93	7.85±0.73

Values expressed as mean ± standard error of the mean, * p ≤ 0.05. Analysis of variance test - ANOVA with Dunnet a *posteriori* test.

Table 8. Histopathological evaluations, spermatogenic dynamics and tubular morphometry in rats treated with oxymetholone in reversibility experiment.

Parameters	COR	O5R	O10R
Normal seminiferous tubules (%)	86.00 (78.00 – 89.00)	81.00 (77.00 – 87.00)	80.50 (73.50 – 82.75)
Seminiferous tubules with acidophilic cells (%)	15.00 (13.00 – 17.00)	14.00 (11.00 – 18.00)	15.00 (14.00 – 19.00)
Seminiferous tubules with vacuolization (%)	3.00 (4.00 – 6.00)	4.00 (2.00 – 4.00)	3.50 (2.00 – 4.00)
Stages I-VI (%)	45.50 (43.00 – 47.00)	41.00 (39.00 – 43.00)	40.00 (38.00 – 42.00)
Stages VII-VIII (%)	16.00 (14.00 – 18.50)	16.50 (15.00 – 19.00)	17.50 (16.00 – 20.00)
Stages IX-XIII (%)	31.50 (30.00 – 34.00)	34.00 (32.00 – 36.00)	32.00 (31.00 – 36.00)
Stages XIV (%)	5.50 (4.00 – 7.00)	7.50 (5.00 – 10.00)	7.00 (5.75 – 10.00)
Tubular Diameter (µm)	90.17±1.23	88.72±2.43	88.89±2.18
Height of the seminiferous epithelium (µm)	283.67±3.8	280.21±4.2	281.33±4.4

Values expressed in medians and interquartile ranges ¹ or means ± SEM ², p <0.05. One-way ANOVA followed by Tukey or Dunn test, respectively.

Capítulo II

**A Reversão de Efeitos Deletérios na Reprodução é Possível
Após o Tratamento com Estanozolol em Ratos?**

A Reversão de Efeitos Deletérios na Reprodução é Possível Após o Tratamento com Estanozolol em Ratos?

Deus Junior RS^{1,2}, Rosa JL³, Figueiredo TM³, Dolder MAH¹

¹Universidade de Campinas – UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, Brasil

²Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

O uso de esteroides anabolizantes vem crescendo atualmente entre atletas e amadores que buscam aumentar o desempenho nos exercícios e a quantidade de massa magra no corpo. Os anabolizantes são medicamentos sintéticos derivados de andrógenos, hormônios sexuais masculino, e dos mais utilizados é o estanozolol, porém, seus reais efeitos na reprodução masculina precisam ser mais compreendidos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade reprodutiva do estanozolol em ratos tratados por 70 dias e após período de repouso, avaliar ainda se ocorre a reversão dos possíveis efeitos deletérios causados pelo tratamento. **Métodos:** Foram utilizados 52 ratos e 30 ratas, divididos em duas avaliações, na primeira, a avaliação imediata, os ratos sofreram eutanásia um dia após o encerramento do tratamento. Sendo assim, foram divididos 21 ratos em 3 grupos (n=7): grupo controle (CE) que foi tratado com o veículo utilizado para a diluição da medicação (solução salina); E5 foi tratado com 5mg/kg de estanozolol e E10 recebeu 10mg/kg de estanozolol. Após 70 dias, os animais foram pesados, submetidos à eutanásia e após incisão da cavidade abdominal tiveram seus órgãos reprodutivos pesados e coletados para avaliações futuras. Dentre as avaliações, foram realizadas técnicas de qualidade espermática, histologia testicular e dosagens hormonais. Ainda, 10 ratos e 30 fêmeas foram utilizadas para realização da técnica de inseminação artificial intrauterina. Em outro momento foi realizado a avaliação tardia, onde os ratos receberam o tratamento por 70 dias e depois ficaram mais 70 dias sem receber o tratamento e em seguida sofreram a eutanásia, nesta avaliação foram utilizados 21 ratos que foram divididos como na primeira avaliação, com intuito de observar se os possíveis efeitos deletérios observados na avaliação imediata. **Resultados:** os resultados da avaliação imediata mostraram redução no peso dos órgãos ligados a reprodução em ambas as doses, bem como a redução da concentração dos hormônios LH, FSH e testosterona intratesticular nas duas doses testadas. Também foi observado diminuição das espermátides maduras nos testículos em E5 e E10, com redução da produção diária de espermatozoides nos dois grupos. No epidídimo, foi observado diminuição do número de espermatozoides e aceleração do trânsito espermático em todos os compartimentos do órgão (cabeça-corpo e cauda) e ainda com a IA os resultados expressaram diminuição do potencial fértil e aumento das perdas pré-implantação. Na avaliação tardia, os resultados estatisticamente significantes apareceram somente na contagem espermática do testículo e no epidídimo e na motilidade espermática. **Conclusão:** O estanozolol pode estar relacionado com a infertilidade masculina durante o tratamento, em doses altas ou baixas. Porém seus efeitos toxicológicos nos parâmetros ligados a reprodução masculina parecem ser revertidos parcialmente após a interrupção do tratamento, trazendo ainda preocupações quanto a fertilidade masculina.

INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são medicamentos com a capacidade de aumentar a massa muscular, aumentar a performance nos esportes e diminuir a porcentagem de gordura corporal e cada vez mais ganham adeptos ao uso indiscriminado e desnecessário dessa classe de remédios que são moléculas químicas sintéticas de andrógenos como a testosterona, já que atualmente a preocupação com a aparência física é um comportamento que atinge grande parte da população mundial (Angell, Chester et al., 2012, Busardo, Frati et al., 2015). Sendo assim, o medicamento com finalidade terapêutica no tratamento de várias doenças, como osteoporose, hipogonadismo, queimaduras, caquexia entre outras, torna-se um vilão da saúde pública pelo uso irresponsável (Ganesan and Pellegrini, 2018).

Segundo vários trabalhos científicos, os efeitos deletérios da utilização dos EAAs causam danos que vão de problemas psicológicos até mesmo a causa de cânceres hepáticos e doenças cardiovasculares, mesmo assim a utilização dos anabolizantes só aumenta, considerando que muitos usuários acreditam que estes efeitos não sejam permanentes. A problemática do uso indiscriminado dos EAAs se estabelece de forma global (Vargas, Oliveira et al., 2013, Kantarci, Punduk et al., 2017).

Pesquisadores do mundo todo, tentam prever o número de usuários em seus países, mas o número pode ser maior do que o divulgado levando em consideração a venda ilegal destes medicamentos no mercado negro. Nos EUA estudos revelam números entre 1 e 1,5 milhões de usuários, em outros estudos estes números variam entre 3 e 3,5 milhões (Lindstrom, Nilsson et al., 1990, Yesalis, Kennedy et al., 1993, Street, Antonio et al., 1996, Bahrke, Yesalis et al., 2000, Kanayama, Gruber et al., 2001, de Souza and Hallak, 2011). Nos países como Canadá, Suécia, Reino Unido, Austrália e África do Sul, pesquisadores sugerem que 1-3% dos alunos do ensino médio já utilizaram EAAs (Yesalis and Bahrke, 2000, Angell, Chester et al., 2012). E ainda, estudos brasileiros revelam que entre praticantes de musculação essa porcentagem aumenta de forma acentuada, com incidência entre 11,1 e 24% de frequentadores admitem já terem

feito uso desta medicação para fins estéticos (Silva and Moreau, 2003, Silva, Machado Júnior et al., 2007, Iriart, Chaves et al., 2009).

O estanozolol é EAA muito conhecido e frequentemente utilizados. Os usuários têm a intenção de melhorar sua performance e aparência física e apostam na sua elevada atividade anabólica e efeitos androgênicos diminuídos em relação a outros esteroides sintéticos. Clinicamente é utilizado nos tratamentos de sarcopenia, osteoporose, perda muscular e artrite reumatoide. Seus principais efeitos são o potencial de influenciar a estruturação de massa magra, a reparação tecidual, o aumento na síntese de colágeno e no metabolismo ósseo (Castro Martins, Peffers et al., 2018, Ozcagli, Kara et al., 2018).

Pesquisas envolvendo o uso de animais são muito utilizadas em trabalhos que avaliam a toxicidade sistêmica, porém, quando se trata da avaliação de anabolizantes e reprodução masculina a literatura é escassa (Ahmed, 2015). Apesar disso, pesquisas feitas com estanozolol apontam que este medicamento pode iniciar efeitos de destruição crônica de células testiculares, baseados em análises histológicas (Mohd Mutalip, Surindar Singh et al., 2013). Ainda, em estudos realizados em pôneis, mostraram que a largura escrotal é reduzida nessa espécie e ocorre a alteração na concentração de testosterona e gonadotrofinas no sangue deste animal após o uso deste EAA (Blanchard, Elmore et al., 1983, Garcia, Ganjam et al., 1987).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto na reprodução, no que se refere a qualidade espermática e infertilidade, em ratos tratados com estanozolol após o período de tratamento de 70 dias, que é o período de tratamento semelhante àquele utilizado pelos usuários desta medicação para fins estéticos, esta foi denominada avaliação imediata e para avaliar a reversão das possíveis alterações após repouso no tratamento com o período de duração de 70 dias, possibilitando análises em um ciclo espermatogênico renovado, a avaliação tardia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 52 machos e 30 fêmeas de ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), com 45 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e mantidos no Biotério de pequenos mamíferos do Departamento de Morfologia no Instituto de Biociências, Botucatu/SP. Os animais foram mantidos por 30 dias para adaptação às novas condições ambientais antes de iniciar o experimento. Os ratos foram acondicionados em caixas de polipropileno (43cm x 30cm x 15cm) utilizando maravalha autoclavada como cama. A temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) foi controlada por termostato e o ciclo claro-escuro foi mantido. Água e alimentos foram oferecidos *ad libitum*. Os protocolos experimentais seguiram os Princípios Éticos na Pesquisa Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal (CEUA) da UNESP, Botucatu/SP (protocolo número 938).

Experimento

Na avaliação imediata, foram utilizados 21 ratos, com 75 dias e pesando aproximadamente 250g. Os animais foram divididos em 3 grupos com 7 ratos em cada grupo: CE foi o grupo controle, tratado com salina, E5 e E10 tratados com estanozolol diluídos em salina e representavam as dosagens de 5mg/kg e 10mg/kg respectivamente. Os ratos foram tratados semanalmente através de injeção intramuscular pelo período de 70 dias.

Ainda, 10 ratos foram mantidos nas mesmas condições, porém não receberam tratamento. Quando completaram 90 dias, eles foram vasectomizados para estimular o corno uterino das fêmeas (n=30) na técnica de inseminação artificial intrauterina (Fernandez, Fernandes et al., 2017). As fêmeas foram mantidas em sala diferente, com ciclo reverso, 2 semanas antes da inseminação.

Na avaliação tardia, foram utilizados 21 ratos com as mesmas características da primeira avaliação e foram divididos da mesma forma, a letra "R" foi utilizada nos grupos deste teste para diferenciá-los do primeiro (CER, E5R

e E10R). Os ratos foram tratados semanalmente através de injeção intramuscular pelo período de 70 dias, após isto, os animais ficaram 70 dias sem receber tratamentos (repouso) para avaliação da reversão dos possíveis efeitos deletérios.

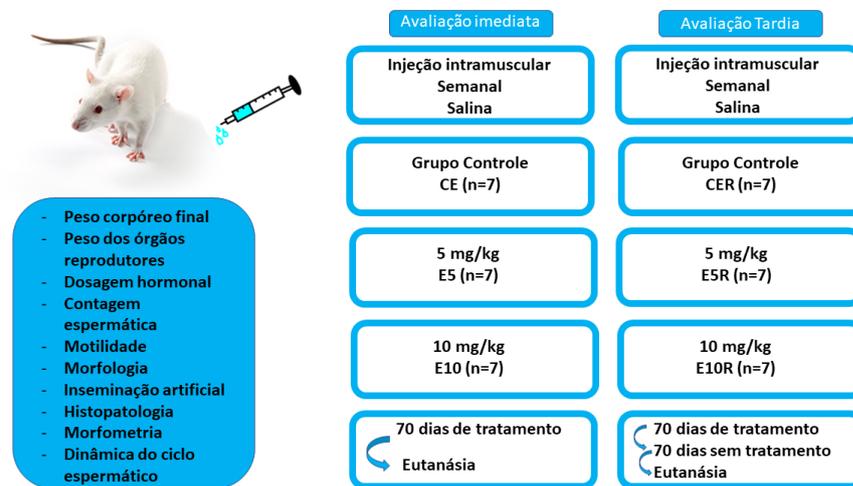


Figura 1. Esquema dos tratamentos e avaliações realizadas.

Eutanásia

Após o tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ seguido de punção cardíaca para coleta de amostra de sangue. O sangue foi centrifugado e mantido em refrigerador -8°C para futura análise de concentração sérica hormonal.

Após incisão abdominal, o epidídimo esquerdo foi localizado e a região da cauda do epidídimo foi removida para coleta de espermatozoides para a técnica de inseminação artificial *in utero*, para motilidade espermática e congelados a -20°C para morfologia espermática e determinação da contagem espermática e tempo de trânsito espermático juntamente com o cabeça/corpo do epidídimo esquerdo. O testículo esquerdo foi coletado e pesado, após isso foi descapsulado, centrifugado e congelado a -20°C para se obter o fluido testicular, utilizado para determinar a concentração sérica de hormônio testosterona intratesticular. O testículo direito foi armazenado para futuramente serem realizadas as análises histopatológicas, morfométricas e determinação da dinâmica do ciclo espermático. Outros órgãos reprodutores (vesícula seminal e próstata ventral) também foram pesados.

Fixação para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

O testículo direito teve a túnica albugínea seccionada nos polos com ajuda de tesouras cirúrgicas e foi imerso em fixador Bouin por 24 horas, como descrito por Russell et al. (1993). Em outro momento, esse órgão foi processado histologicamente e foi incluído em Paraplast, após isso, cortado em micrótomo na espessura de 5µm em três regiões diferentes do testículo, para evitar avaliar as mesmas secções. Os cortes foram corados em HE para análise histopatológica, morfométrica e dinâmica do ciclo espermatogênico (Russell, Ren et al., 1990).

Avaliação histopatológica

Para realização desta avaliação, foram examinadas 100 secções de túbulos seminíferos aleatórias, inspecionando os conteúdos do lúmen e do interstício e aspectos do epitélio dos testículos. Os túbulos foram classificados anormais, quando houve a presença de: células acidófilas, vacuolização, degeneração do epitélio germinativo, esfoliação de células no lúmen, espermátides retidas e células multinucleadas. Não havendo a presença de alterações, foram considerados normais. Quanto ao conteúdo do interstício, foram avaliados somente de forma qualitativa. Nesta avaliação, foi utilizado microscópio de luz Leica® (aumento de 400x).

Dinâmica do ciclo espermático

Objetivando estimar a frequência de estágios da espermatogênese nos túbulos seminíferos, que pode determinar a duração e o ritmo do processo espermatogênico, foram examinadas, de forma aleatória, 100 secções destas estruturas coradas com HE e classificadas de acordo com o descrito a seguir: estágio I-VI (possui duas gerações de espermátides), estágio VII-VIII (possui espermátides maduras localizadas na borda do lúmen), estágio IX-XIII (possui somente uma geração de espermátide), estágio XIV (apresenta espermátocito secundário).

Análise morfométrica dos testículos

Com a finalidade de analisar o diâmetro do túbulo seminífero e a espessura do epitélio germinativo, foram analisadas 10 secções de túbulos seminíferos corados em HE de cada animal dos grupos experimentais. Porém, esta análise foi realizada somente em túbulos seminíferos no estágio IX da espermatogênese, onde é possível definir com mais clareza os limites entre o lúmen e o epitélio germinativo. Nesta análise foram utilizados um microscópio Leica®, aumento de 400X e o *software* Leica Q-win Version 3 for Windows™, como analisador de imagens.

Dosagem de testosterona intratesticular, testosterona, progesterona, FSH e LH

Para o teste de dosagens hormonais, o fluído testicular obtido no dia da eutanásia, que foi centrifugado e mantido a -20°C foi analisada para verificar a quantidade de testosterona intratesticular. O soro, obtido através de sangue coletado por punção cardíaca e centrifugação a 700 G por 20 minutos a 4°C foi usado para analisar testosterona, progesterona, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante. Estes ensaios foram realizados pela técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo no laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Todos os ensaios foram realizados ao mesmo tempo evitando o erros inter-ensaio, enquanto que para as variabilidades intra-ensaio foram adotadas as de 4% para testosterona, 2,8% para o FSH, 3,4% para o LH e 2,6 para a progesterona. Para avaliar as concentrações de FSH e LH foram utilizados kits fornecidos pelo National Institute of Arthritis and Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK), enquanto para testosterona sérica e intratesticular, foram utilizados kits Coat-a-Count® assay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA).

Cálculo da produção diária de espermatozoide (PDE) por testículo e contagem do número e tempo de trânsito dos espermatozoides no epidídimo

Para análises nos testículos, o testículo direito de cada rato foi descapsulado, centrifugado e congelado a -4°C até a realização do ensaio. No dia da avaliação, o parênquima testicular foi descongelado (sob gelo) e processado em homogeneizador de tecidos em 5mL de solução de salina(0.9%)+triton-X100(0,05%)+mertiolate(0,01%) (STM). Após isso, a amostra foi diluída em solução STM na proporção de 10 vezes (100 μL amostra + 900 μ de STM), em seguida processado em sonificador por 30 s e dessa diluição, aproximadamente 20 μL foram utilizados para a observação em duas câmaras de Neubauer (5 campos por animal). As amostras foram analisadas em microscópio óptico Leica® no aumento de 400x. Para calcular o número de espermátides maduras e a PDE foi utilizado o mesmo método de Robb et al. (1978). A mesma metodologia de processamento de materiais foi utilizada para a cabeça/corpo e a cauda do epidídimo. Para estimar o tempo de trânsito dos espermatozoides neste órgão, foi dividido o número de espermatozoides em cada região do epidídimo pela PDE.

Motilidade espermática

O esperma proveniente da cauda do epidídimo, através de *poking*, diluídos em meio humano tubário (HTF – human tubal fluid) foi utilizado para as técnicas de motilidade e morfologia espermática e para a técnica de inseminação artificial *in utero*. Na motilidade, 10 μL de amostra diluída em HTF foram colocados em uma câmara Makler e analisada sob microscópio de luz da marca Leica®, no aumento de 400x, para realizar a contagem de 100 espermatozoides aleatórios de acordo com a sua motilidade, ou seja, os gametas foram classificados em: Tipo A (móvel, com trajeto progressivo, tipo B (móvel, sem trajeto progressivo) ou tipo C (imóvel).

Morfologia espermática

Os espermatozoides obtidos através do *poking* na cauda do epidídimo foram mantidos em *eppendorf* contendo 100µL de amostra e 900µL de solução salina com formol 10%. Na avaliação deste teste, uma gota de amostra, foi transferida para lâmina histológica, coberta com lamínula e mantida em temperatura ambiente até a secagem da mesma (cerca de 90 minutos) após observação em microscópio com sistema de contraste de fases no aumento de 400X (Seed, Chapin et al., 1996). Foram analisados 200 espermatozoides quanto às anormalidades morfológicas. As anormalidades foram classificadas como de cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete e isolada) e de cauda (enrolada, quebrada, dobrada ou dupla), anormalidades que comprometem a fecundação do gameta feminino pelo espermatozoide (Filler, 1993).

Técnica de inseminação artificial intrauterina ou in utero (IA) e avaliação de fertilidade

Neste experimento 30 fêmeas foram disponibilizadas. As 21 fêmeas que estavam receptivas aos machos previamente vasectomizados (cauterização de ductos deferentes) e com limpeza dos ductos espermáticos realizada (sem espermatozoides), foram escolhidas para a realização da técnica de inseminação artificial *in utero*. Nesta técnica, os espermatozoides provenientes da técnica de *poking* e diluídos em meio HTF na proporção de 1/10 foram contados em câmara de Neubauer e injetados 5×10^6 espermatozoides em cada corno uterino, como descrito por Klinefelter et al., (1994) e Kempinas et al., (1998a). Cada fêmea recebeu, após exposição do corno uterino por abertura abdominal, os espermatozoides de um rato dos grupos tratados e depois teve seu abdômen suturado. Foram mantidas isoladamente em gaiolas e monitoradas várias vezes durante o dia. Após 20 dias, essas mesmas fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO₂, seguida por decapitação para a realização da coleta de parâmetros relativos à fertilidade. No ovário, o peso do órgão e número de corpos lúteos foi avaliado. No útero, o número de reabsorções, de implantes e de fetos, bem como o peso do órgão e dos fetos também foi mensurado. Frente

a esses resultados, foi possível definir o potencial fértil (eficiência das implantações): número de implantações/número de corpos lúteos $\times 100$; a taxa de prenhez: número de fêmeas prenhes / número de fêmeas inseminadas $\times 100$; taxa de perda de pré-implantação: (número de corpos lúteos-número de implantes/número de corpos lúteos) $\times 100$ e a taxa de perda pós-implantação: (número de implantes-número de fetos vivos)/números de implantes $\times 100$.

A IA foi realizada somente na avaliação imediata, levando em consideração a política dos 3 “Rs”, reduzir, reciclar e reutilizar e ainda, partindo do pressuposto que com a melhora da qualidade espermática, haveria melhora na fertilidade.

Análises de resultados

Para a comparação de resultados entre os grupos de ratos tratados com estanozolol e o grupo controle foi utilizado ANOVA, quando paramétrico, e foi seguido pelo teste de Dunnett; caso contrário, pelo *posteriori* Kruskal-Wallis. Ainda, quando a intenção foi avaliar a associação entre variáveis qualitativas, o teste chi-quadrado foi adotado. Neste estudo, os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando tiveram valor de $P \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPAAd Prism (6.00).

RESULTADOS

Na avaliação imediata, os animais foram pesados e depois sacrificados, os órgãos reprodutivos, foram pesados em balança de precisão. Com isso, não foi observado nenhuma diferença entre os pesos corpóreos finais dos grupos.

Quanto ao peso dos órgãos ligados a reprodução todos eles apresentaram uma redução no peso (Tabela 1), com exceção do peso da vesícula seminal vazia que foi estatisticamente significante somente no grupo E5, quando analisado o peso relativo deste órgão neste grupo, a atrofia deste órgão não se repete.

Tabela 1. Peso corpóreo final e peso de órgãos reprodutivos

Parâmetros	CE	E5	E10
Peso corpóreo final (g)	473,20±12,44	465,70±21,14	457,00±20,25
Próstata ventral (mg)	608,50±44,77	272,40±50,23***	338,90±43,68**
Próstata ventral relativa (mg/100g)	128,70±9,05	57,41±9,41***	75,51±11,15**
Vesícula seminal cheia (mg)	1203,00±133,50	504,50±127,90**	572,20±105,00**
Vesícula seminal cheia relativa (mg/100g)	252,00±23,77	107,00±24,94**	127,80±26,87**
Vesícula seminal vazia (mg)	510,80±68,81	312,50±58,62*	331,80±39,00
Vesícula seminal vazia (mg/100g)	106,60±12,18	67,73±12,41	73,74±26,82
Epidídimo (mg)	709,20±22,33	421,20±82,41**	384,90±19,15***
Epidídimo (mg/100g)	150,20±4,82	89,71±15,76***	85,05±5,48***
Testículo (g)	1,86±0,05	1,20±0,18**	1,11±0,05***
Testículo relativo (mg/100g)	395,30±18,87	256,20±32,24**	247,40±16,55***

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001. Teste análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

Houve reduções dos níveis de LH, FSH e testosterona intratesticular em todos os grupos. A média dos níveis de progesterona, no grupo E5, ficou semelhante ao do controle e na maior dose houve redução significativa. Na avaliação de testosterona circulante, não foi observado alterações significantes estatisticamente (Figura 2).

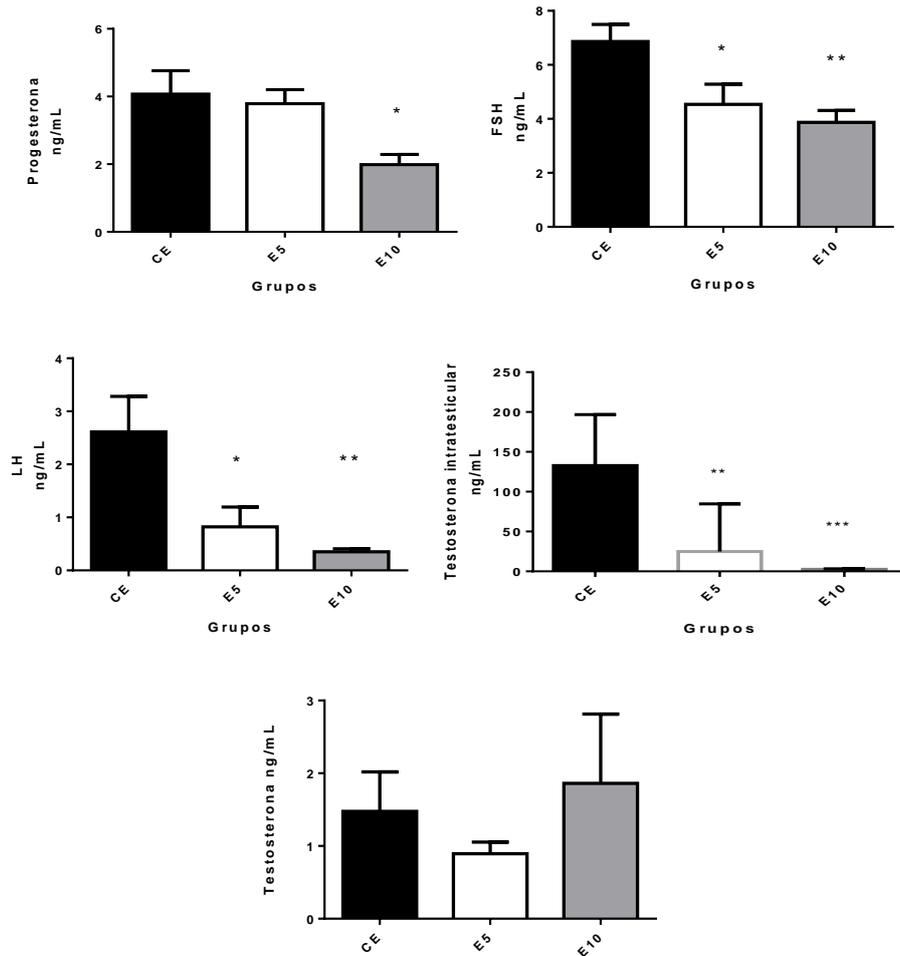


Figura 2 - Concentrações séricas e intratesticular de hormônios. Teste análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Na contagem espermática testicular, observamos redução das espermátides maduras e de produção espermática diária (PDE) em ambos os grupos tratados, no entanto, quando analisados o número de espermátides e a PDE por grama de testículo, o resultado não se repete (Tabela 2).

Na contagem espermática epididimária, os dois grupos tratados apresentaram uma redução no número de espermatozoides tanto na cabeça-corpo quanto na cauda do epidídimo e também uma aceleração no trânsito espermático (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem espermática e tempo de trânsito espermático.

Parâmetros	CE	E5	E10
<i>Contagem espermática testicular</i>			
Espermátides maduras (x10⁶/testículo)	194,00±21,19	116,20±19,68*	118,60±13,57*
Espermátides maduras (x10⁶/g/testículo)	123,90±12,15	114,80±8,66	122,50±13,04
Produção espermática (x10⁶/testículo/ diária)	31,81±3,47	19,05±3,2*	19,44±2,22*
Produção espermática (x10⁶/testículo/g/ diária)	20,31±1,99	18,82±1,42	20,08±2,13
<i>Contagem espermática epididimária</i>			
<i>Cabeça/corpo</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/órgão)	143,70±15,93	43,55±18,35***	15,82±3,13****
Tempo de trânsito espermático (dias)	4,60±0,46	1,73±1,48***	0,94±0,27****
<i>Cauda</i>			
Nº de espermatozoides (x10⁶/órgão)	268,50±16,91	81,44±34,96****	40,56±3,08****
Tempo de trânsito espermático (dias)	9,77±0,83	4,60±9,68**	1,49±5,33***

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. Teste análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett.

Quanto à motilidade espermática, fator importante para avaliar a qualidade espermática, foi observado que houve uma diminuição dos espermatozoides do tipo A (móvel, com movimento progressivo) em ambos os grupos tratados, o número de espermatozoides do tipo B (móvel, sem movimento progressivo) foi similar entre os grupos comparados ao controle e em referência aos gametas de tipo C (imóvel), somente o grupo tratado com maior dose teve aumento significativa (Figura 3).

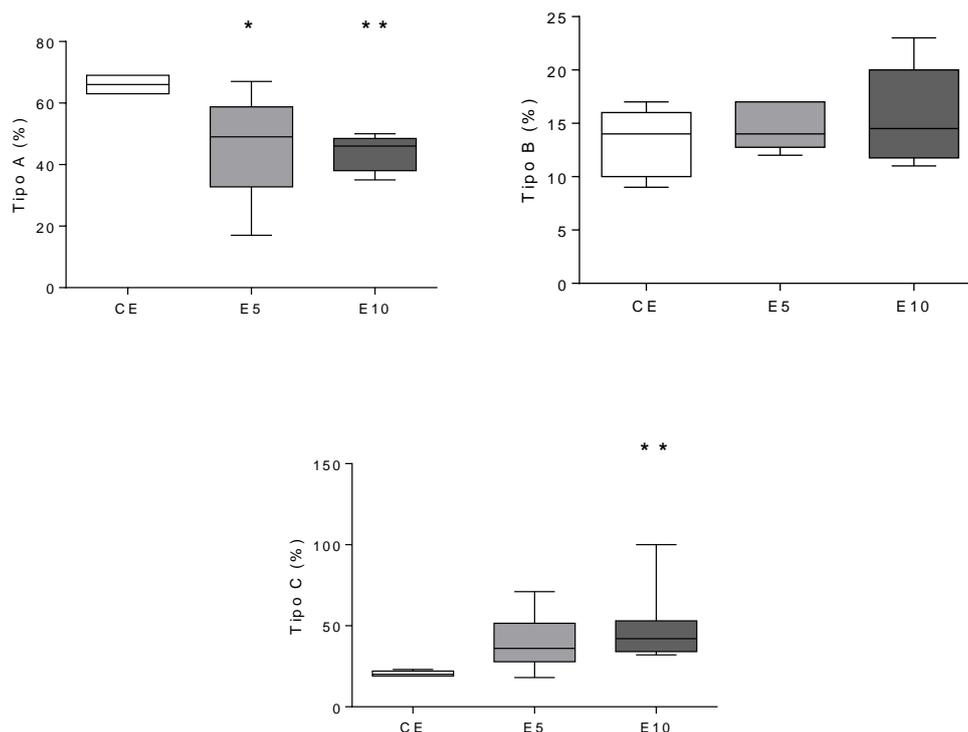


Figura 3. Motilidade espermática. Valores expressos como mediana (1º quartil - 3º quartil), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

No que concerne a morfologia espermática somente o grupo E10 apresentou uma redução no número de espermatozoides normais. Quanto aos anormais, todos os grupos tiveram aumentos estatisticamente expressivos no número de anormalidades de cabeça e o grupo E10 ainda mostrou o mesmo resultado nas anormalidades de cauda. Nenhum grupo apresentou alterações quanto à gota citoplasmática, quando contraposto aos resultados do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Morfologia espermática

Parâmetros	CE	E5	E10
Espermatozoides normais (%)	97,50 (93,00-99,00)	93,50 (74,00-97,00)	71,50 (33,00-74,00)**
Espermatozoides anormais (%)			
Anormalidade de cabeça	2,00 (0,50-6,50)	4,50 (1,00-8,50)*	12,50 (9,00-15,00)*
Anormalidade de flagelo	0,50 (0,00-0,50)	1,00 (0,50-2,50)	22,00 (15,00-54,00)***
Gota citoplasmática	29,50(24,00-35,50)	17,00(5,50-36,00)	19,00(12,00-26,00)

Valores expressos como mediana (1º quartil - 3º quartil), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

A tabela 4 expõe os resultados da laparotomia após inseminação artificial *in utero* e mostra uma redução considerável no potencial fértil em E5 e E10, com $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$ respectivamente.

Quanto as perdas pré-implantação, também houve aumento significativo em ambos os grupos. Enquanto as perdas pós-implantação tiveram resultados consistentes com o controle.

Tabela 4. Ensaios de fertilidade após inseminação artificial *in utero*.

Parâmetros	CE	E5	E10
Taxa de prenhez (%)	83,30	85,70	42,86
Potencial fértil (%)	82,10	57,00**	37,50***
Perda pré-implantação (%)	17,80	43,10*	62,50***
Perda pós-implantação (%)	30,40	40,00	26,66

Valores expressos em porcentagem (teste chi-quadrado) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Na tabela 5, podemos analisar os resultados da avaliação histopatológica, onde é possível observar a diminuição de túbulos seminíferos normais e concomitante a isso, o aumento de túbulos com vacuolizações e células acidófilas nos grupos tratados com estanozolol, sendo que o aumento de células acidófilas pode ser observado na figura 4. Quanto à dinâmica espermatogênica, os resultados mostram apenas um aumento no estágio que vai do ciclo VII-VIII em E5, nos demais, os resultados foram similares ao grupo controle. Já em relação a morfometria dos túbulos seminíferos, os dados obtidos revelam a diminuição do diâmetro dos túbulos e ainda a redução na altura do epitélio seminífero, nos animais tratados com o anabolizante estudado.

Tabela 5. Avaliações histopatológicas, dinâmica espermatogênica e morfometria tubular em ratos tratados com estanozolol

Parâmetros	CE	E5	E10
Túbulos seminíferos normais (%) ¹	86,00 (84,00 – 90,00)	43,00 (37,50 – 49,50)***	50,00 (43,00 – 67,00)*
Túbulos seminífero com células acidófilas (%) ¹	11,00 (7,00 – 13,00)	34,00 (29,75 – 35,50)***	27,00 (21,00 – 33,00)*
Túbulos seminíferos com vacuolização (%) ¹	4,00 (3,00 – 5,00)	23,00 (19,50 - 25,25)**	22,00 (12,00 – 24,00)**
Estágios I-VI (%) ¹	33,00 (31,00 – 40,00)	41,50 (38,25 – 44,00)	26,50 (24,75 – 33,25)
Estágios VII-VIII (%) ¹	24,00 (23,00 – 27,00)	19,00 (14,50 – 20,50)*	24,50 (22,75 – 27,25)
Estágios IX-XIII (%) ¹	34,00 (31,00 – 33,25)	34,00 (31,25 – 38,25)	35,50 (32,75 – 39,50)
Estágios XIV (%) ¹	7,00 (5,00 – 9,00)	7,00 (5,50 – 8,00)	11,50 (8,00 – 14,25)
Altura do epitélio seminífero (µm) ²	90,10±2,26	72,21±3,60***	68,58±1,93****
Diâmetro tubular (µm) ²	276,20±3,77	223,8±12,31***	231,2±5,69***

Valores expressos em medianas e intervalos interquantil ¹ ou médias ± SEM ², *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001. One-way ANOVA seguido por Tukey ou teste de Dunnett, respectivamente.

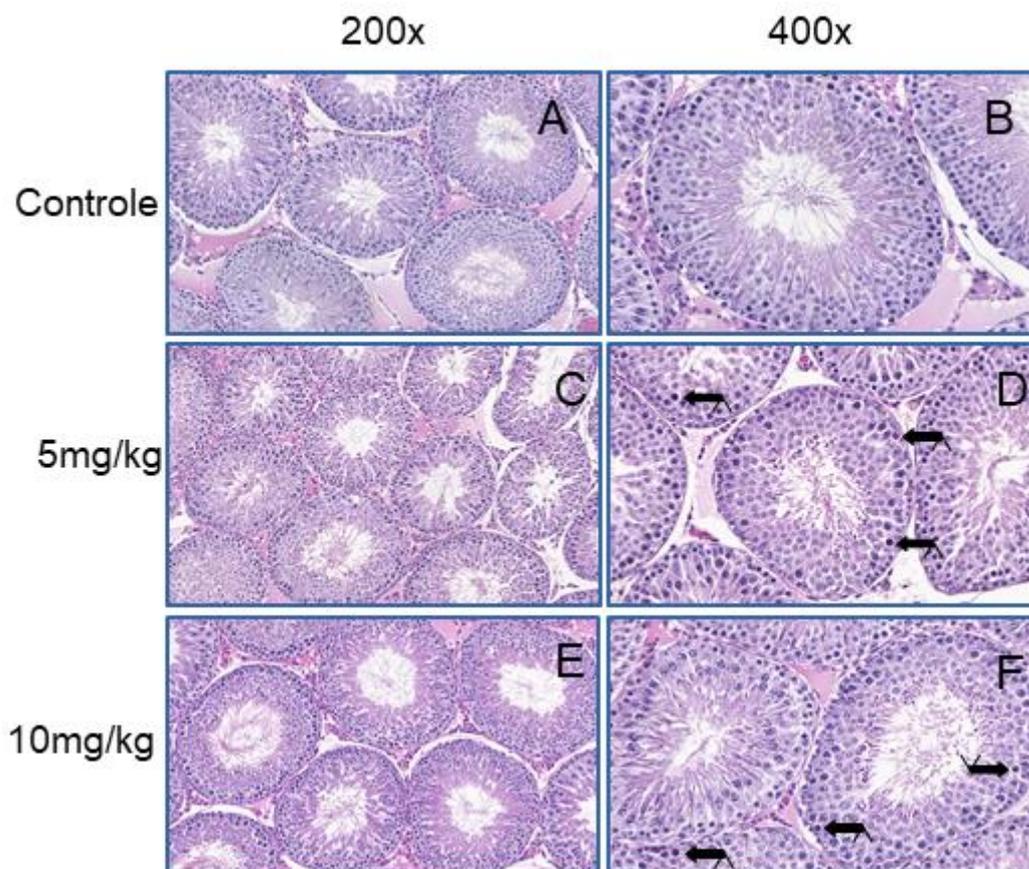


Figura 4. Imagens das secções testiculares dos grupos experimentais de ratos tratados com estanozolol (Experimento 1). Note que em D e F, as setas apontam para células acidófilas

A avaliação tardia teve a finalidade de analisar possíveis reversões nos resultados após o tratamento com estanozolol ou ainda efeitos tardios do uso deste anabolizante.

Na tabela 6 é possível analisar o peso corporal e dos órgãos após o tratamento e o repouso de 70 dias sem o uso da medicação e os resultados obtidos mostram que somente a próstata em E5R apresentou diminuição estatisticamente relevante em relação ao grupo controle. Nos outros órgãos avaliados as médias ficaram semelhantes as médias do grupo controle.

Tabela 6. Peso corpóreo final e peso de órgãos reprodutivos, aferido 70 dias após suspensão do tratamento com estanozolol, avaliação tardia.

Parâmetros	CER	E5R	E10R
Peso Final (g)	406,50±13,03	386,60±16,03	391,80±11,77
Próstata ventral (mg)	720,10±56,57	533,80±29,18*	704,70±35,06
Próstata ventral relativa (mg/100g)	137,80±11,16	106,10±6,52*	133,70±9,30
Vesícula seminal cheia (g)	1,4±0,09	1,34±0,07	1,39±0,10
Vesícula seminal cheia relativa (mg/100g)	267,90±16,85	268,20±19,39	264,30±22,63
Vesícula seminal vazia (mg)	547,10±51,63	509,70±42,44	518,10±19,75
Vesícula seminal vazia (mg/100g)	105,10±10,84	102,30±10,71	98,02±5,32
Epidídimo (mg)	691,90±44,91	667,30±23,98	635,00±43,46
Epidídimo (mg/100g)	132,10±8,46	133,20±7,60	121,30±10,81
Testículo (g)	1,94±0,06	1,81±0,07	1,87±0,07
Testículo relativo (mg/100g)	371,00±15,38	363,20±23,07	353,10±14,97

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p≤0,05. Teste análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

Na avaliação tardia, os resultados expressados nas dosagens hormonais não apontam diferenças estatisticamente significantes nos hormônios LH, FSH, progesterona e testosterona circulante em nenhum dos dois grupos tratados (Figura 5).

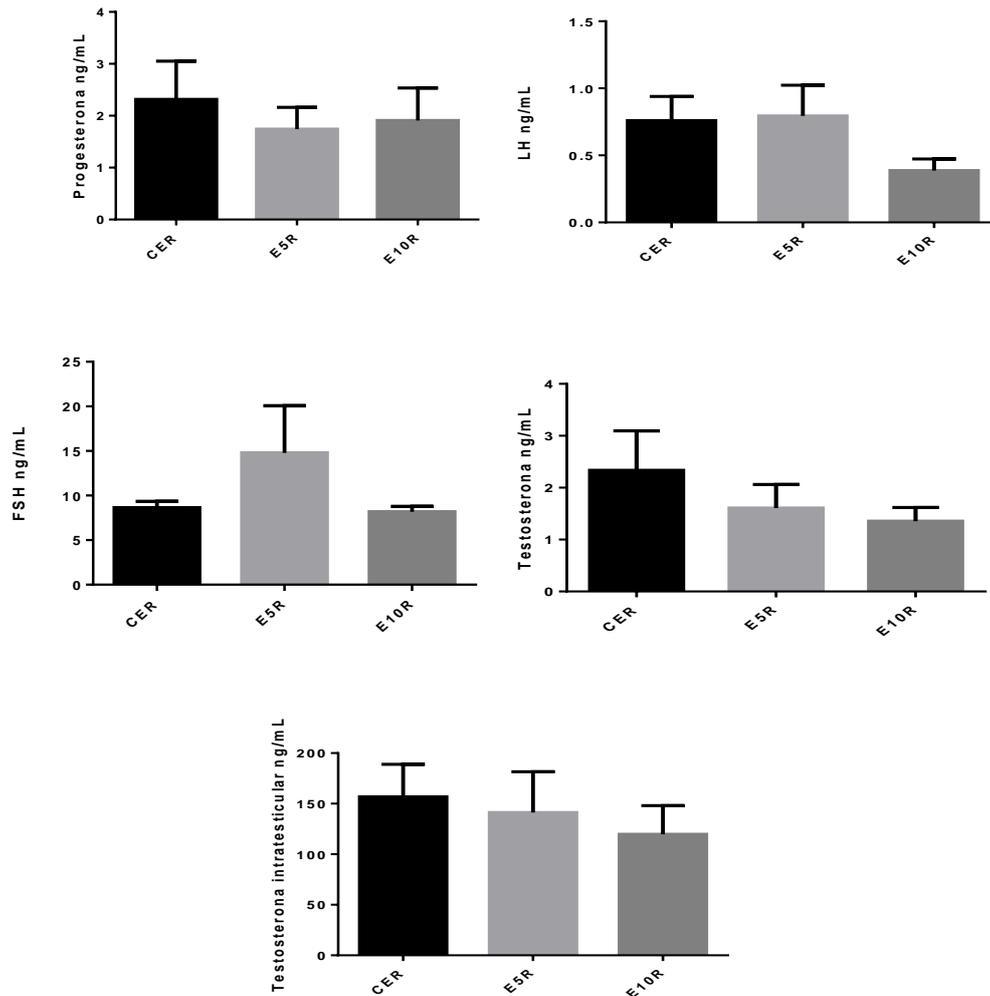


Figura 5 - Concentrações séricas e intratesticular de hormônios, 70 dias após suspensão do tratamento com estanozolol, avaliação tardia. Teste análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett, $p \geq 0,05$.

Na tabela 7 estão expressos os resultados da contagem espermática testicular e eles revelam que somente o grupo E5 apresentou redução estatisticamente significativa no número de espermátides maduras por grama de testículo e também na produção diária espermática (PDE). Ainda esta tabela, mostra os resultados da contagem no epidídimo e revela que a menor dose reduziu o número de espermatozoides na cabeça-corpo deste órgão e na cauda, ambas as doses tiveram os resultados reduzidos.

Tabela 7. Contagem espermática e tempo de trânsito espermático, avaliação tardia.

Parâmetros	CER	E5R	E10R
<i>Contagem espermática testicular</i>			
Espermátides Maduras (x10⁶/testículo)	295,00±18,63	239,20±11,93	255,10±20,76
Espermátides Maduras (x10⁶/g/testículo)	184,00±8,40	154,70±4,70*	161,10±9,64
Produção espermática (x10⁶/testículo/ diária)	48,37±3,05	39,21±1,95	41,82±3,40
Produção espermática (x10⁶/testículo/g/ diária)	30,17±1,37	25,36±0,77*	26,41±1,58
<i>Contagem espermática epididimária</i>			
<i>Cabeça/corpo</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/órgão)	202,80±13,57	139,10±20,86*	156,20±16,67
Tempo de trânsito espermático (dias)	4,20±0,14	3,59±0,48	3,86±0,46
<i>Cauda</i>			
Nº de espermatozoides (x10⁶/órgão)	314,40±32,07	206,10±18,93**	227,00±13,21*
Tempo de trânsito espermático (dias)	6,70±0,85	5,32±0,60	5,76±0,76

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, Teste de análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

A análise de motilidade espermática na avaliação tardia, representada na Figura 6, mostra que somente houve diminuições significativas na motilidade no grupo E5 dos espermatozoides do tipo A e aumento nos do tipo B, já no grupo E10, houve redução nos gametas do tipo A e aumento nos do tipo C.

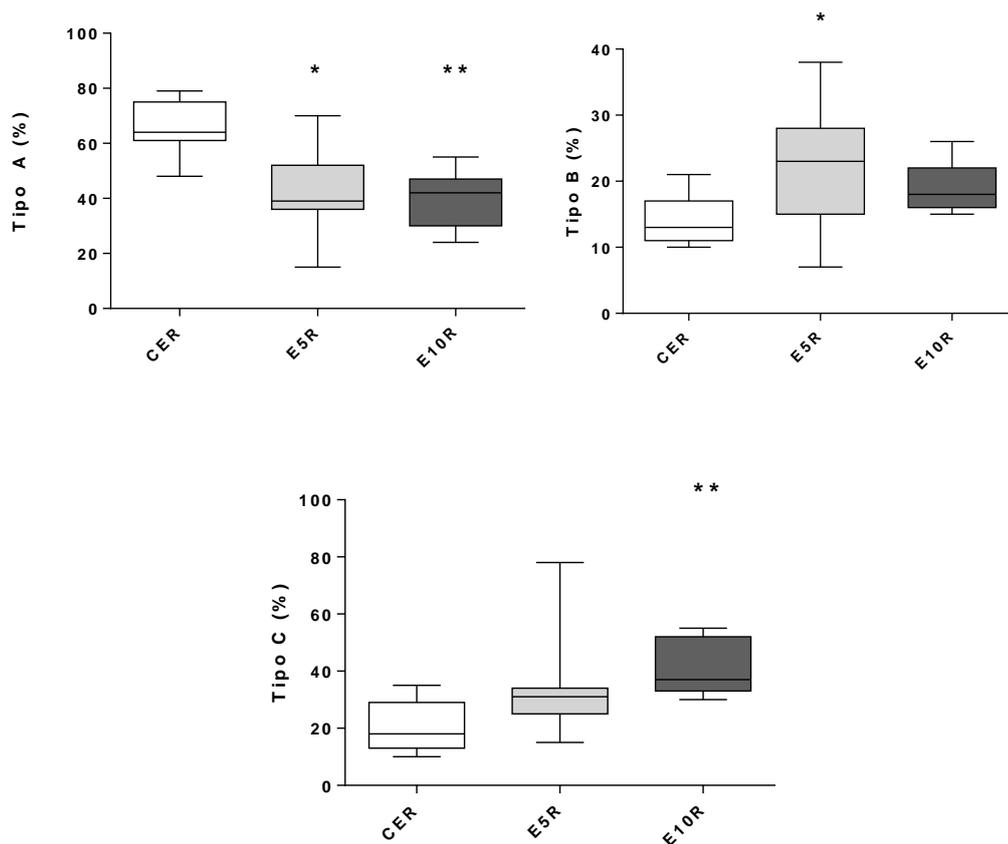


Figura 6 - Motilidade espermática, avaliação tardia. Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnnett.

A morfologia espermática da avaliação tardia está expressa na tabela 8 e é possível observar que nenhum parâmetro avaliado apresentou diferença estatística, os resultados obtidos foram semelhantes entre os grupos tratados e o controle.

Tabela 8. Morfologia espermática 70 dias após suspensão do tratamento com estanozolol, avaliação tardia.

Parâmetros	CER	E5R	E10R
Espermatozoides normais (%)	93,00(91,00-95,00)	93,00(91,00-96,50)	93,00(91,00-95,00)
<i>Espermatozoides anormais (%)</i>			
Anormalidade de cabeça	3,50(1,50-5,00)	3,00(1,00-6,50)	1,50(1,00-2,50)
Anormalidade de cauda	2,50(2,00-6,00)	3,50(1,00-6,00)	5,00(3,50-8,50)
Gota citoplasmática	33,00(30,00-39,50)	36,50(26,00-40,50)	36,50(25,00-44,50)

Valores expressos como mediana (1º quartil - 3º quartil), $p \geq 0,05$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

Como disposto na tabela 9, nas avaliações histopatológicas, dinâmicas espermatogênicas e morfometria dos túbulos seminíferos, não foram obtidos resultados com alterações significativas.

Tabela 9. Avaliações histopatológicas, dinâmica espermatogênica e morfometria tubular 70 dias após suspensão do tratamento com estanozolol, avaliação tardia.

Parâmetros	CER	E5R	E10R
Túbulos seminíferos normais (%)¹	87,00 (86,50 – 91,00)	82,00 (76,00 – 82,00)	82,50 (82,50 – 76,00)
Túbulos seminífero com células acidófilas (%)¹	8,00 (7,00 – 11,00)	7,00 (5,50 – 9,00)	8,00 (6,50 – 9,00)
Túbulos seminíferos com vacuolização (%)¹	3,00 (2,00 – 5,50)	4,50 (3,00 - 4,00)	5,50 (2,00 – 4,50)
Estágios I-VI (%)¹	41,00 (41,50 – 45,00)	43,00 (39,50 – 45,50)	44,00 (40,50 – 46,25)
Estágios VII-VIII (%)¹	18,50 (17,50 – 20,00)	17,50 (16,00 – 19,50)	20,00 (18,00 – 22,00)
Estágios IX-XIII (%)¹	30,00 (28,25 – 31,00)	32,00 (29,50 – 34,00)	31,50 (31,00 – 34,00)
Estágios XIV (%)¹	8,50 (6,00 – 9,50)	8,00 (6,50 – 9,00)	8,50 (7,00 – 9,00)
Altura do epitélio seminífero (μm)²	90,61 \pm 3,21	89,05 \pm 3,52	91,81 \pm 2,6
Diâmetro tubular (μm)²	290,33 \pm 7,54	293,27 \pm 9,85	288,98 \pm 11,10

Valores expressos em medianas e intervalos interquartil ¹ ou médias \pm SEM ², $p < 0,05$. One-way ANOVA seguido por Tukey ou teste de Dunnett, respectivamente.

DISCUSSÃO

O estanozolol é uma medicação muito usada entre atletas profissionais e amadores devido ao fator anabólico que ela possibilita, sendo um dos EAAs mais utilizados no mundo todo (Cunha, Cunha et al., 2004). A toxicidade deste anabolizante no sistema reprodutor masculino precisa ser mais abordado e para avaliação da toxicidade reprodutiva em macho nos modelos experimentais alguns parâmetros são de extrema importância, como por exemplo as análises de qualidade espermática, testes de fertilidade, histopatologia, peso corpóreo e de órgãos (Tyl, 2002).

O peso dos órgãos reprodutores foi analisado neste trabalho, tendo como resultado a redução do peso bruto e relativo de todos os órgãos reprodutores. Achados semelhantes foram encontrados por Mohd Mutalip (2013), que testou o estanozolol e outros dois anabolizantes, e neste estudo, também foi observado a perda de peso nesses órgãos. O que pode ter sido causado pela diminuição na concentração de gonadotrofinas hipotalâmicas (LH e FSH) na circulação sanguínea, já que vários estudos relatam que, com níveis destes hormônios abaixo do normal, é possível ocorrer a supressão da liberação de testosterona nas células de Leydig (Silva, Danielski et al., 2002, Cunha, Cunha et al., 2004, Drobnis and Nangia, 2017, Drobnis and Nangia, 2017) . Na região intratesticular os níveis de testosterona apresentados foram bem abaixo do normal, 82% menor em E5 e 98% menor em E10. Essa região costuma ter a concentração 100 vezes maior que na circulação, e o menor nível deste hormônio pode ter motivado problemas na dinâmica da espermatogênese (Drobnis and Nangia, 2017). Já os níveis de testosterona na circulação não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, o que pode ser explicado levando em conta o tratamento com a droga sintética exógena derivada deste hormônio e que as duas substâncias não são diferenciadas pela análise. Contudo, estes resultados dos níveis séricos de testosterona, corroboram um estudo que avaliou os efeitos do estanozolol e do undecilanato de boldenona em pôneis ganhões, onde foi observado que até a nona semana, que os níveis séricos de testosterona diminuem devido a utilização de andrógeno externo, porém voltam a estabilidade após a décima semana do tratamento (Garcia, Ganjam et al., 1987).

Como já era esperado, devido aos desequilíbrios hormonais causados pelo uso de estanozolol, o número de espermátides maduras por testículo e a PDE aparecem reduzidas em ambos os grupos analisados, porém este resultado pode estar correlacionado à atrofia testicular, que por sua vez é consequência da diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e pela diminuição da espessura do epitélio seminífero. Já no parâmetro que avalia o número de espermátides maduras no órgão e a PDE, levando em consideração o peso dos testículos, a diferença não se repete, tendo resultados similares ao grupo controle. No entanto, no epidídimo, os resultados mostraram uma diminuição drástica no número de espermatozoides em todos os compartimentos deste órgão e ainda acompanhado pela diminuição do tempo de trânsito espermático. Com o tempo de trânsito acelerado, os espermatozoides podem ser ineficazes na fertilidade por estarem imaturos e com aumento nas aberrações morfológicas (Fernandez, Porto et al., 2008, Robaire and Hamzeh, 2011). Achados que corroboram com os deste estudo foram publicados por Blanchard *et al.*, (1983), que também encontrou redução na PDE em pôneis tratados com estanozolol.

Neste estudo foi encontrado redução significativa nos espermatozoides mais eficientes para a fecundação, os do tipo A, móveis e com movimentos progressivos, em todos os grupos que receberam o estanozolol. Também foi observado aumento nos espermatozoides do tipo C, imóveis, no grupo que recebeu a maior dose do tratamento. A motilidade espermática é um parâmetro que categoriza os espermatozoides, permitindo avaliar a possibilidade da fecundação com esta célula (Phillips, 1972). Sendo assim, essas diferenças quanto a motilidade, podem ter sido causadas pela passagem acelerada dessas células pelo epidídimo, órgão responsável pela maturação e ganho de motilidade para os gametas masculinos, fazendo com que ocorra a diminuição de espermatozoides mais aptos e eficazes para realizarem a fecundação (Robaire, Hinton et al., 2006, Ellis and Mahadevan, 2014).

Em relação a morfologia espermática, que pode ser prejudicada por problemas na espermatogênese causada por vários fatores, os resultados demonstraram que houve aumento de espermatozoides anormais no grupo tratado com a maior dose de estanozolol, e ainda, ampliação do número de anormalidades de cabeça foram notadas em ambos os grupos. Estes aumentos corroboram com o desequilíbrio hormonal causado pelo uso deste EAA, já que

o LH é responsável pela estimulação da produção de testosterona pelas células de Leydig e o FSH é responsável pela regulação de sinais e nutrientes nas células de Sertoli, ambas as células, tem funções essenciais para a espermatogênese, que é processo de formação dos espermatozoides. O desequilíbrio hormonal afeta também a concentração de testosterona intratesticular, que é o principal hormônio na estimulação da produção do gameta masculino. Ainda, os resultados histopatológicos demonstraram aumento de células acidófilas e vacuolizações nos túbulos seminíferos, o que indica que houve morte e degeneração de células epiteliais germinativas, ocasionando problemas de espermatogênese. Essa degeneração corrobora com as alterações morfológicas encontradas nessas células (McLachlan, Wreford et al., 1994, Sairam and Krishnamurthy, 2001, Ohta, Miyake et al., 2007, Walker, 2011, Ramaswamy and Weinbauer, 2014, Oduwole, Peltoketo et al., 2018).

Na técnica de inseminação artificial intrauterina, técnica mais sensível do que o comportamento sexual natural, utiliza-se a cauda epididimária para coletar um número pré-fixado de espermatozoides e inseminá-los igualmente nos cornos uterinos, para que as alterações de padrão de comportamento sexual e possíveis reduções de número de gametas masculinos no líquido seminal não interfiram no teste de fertilidade (Klinefelter, 2002, Fernandez, Porto et al., 2008). Desta forma é possível avaliar a capacidade fértil dos espermatozoides dos ratos estudados de forma mais consistente, levando em consideração que cada rata tem aproximadamente um número semelhante de espermatozoides disponíveis em seu útero (Fernandez, Fernandes et al., 2017). Todavia, a inseminação artificial *in utero* foi realizada neste estudo para avaliar a qualidade espermática e com este teste foi observado que ambos os grupos tratados apresentaram diminuição do potencial fértil e aumento de perda pré-implantação, o que sugere uma péssima qualidade espermática nos grupos de ratos que receberam o estanozolol. Tais resultados somente acrescentam e corroboram com os demais itens citados a cima no que se refere à qualidade espermática.

Através da avaliação tardia foi possível demonstrar que o peso dos órgãos reprodutores se recuperou, com exceção da próstata, que continuou expressivamente menor no grupo E5R. Entretanto, as dosagens hormonais foram normalizadas, o que pode justificar a similaridade no peso dos órgãos reprodutores. O fato de a próstata não ter seu peso normalizado, pode ser

explicado considerando que órgãos como próstata e vesícula seminais são os mais sensíveis a alterações quando expostos a baixas concentrações de testosterona, com isso, sua recuperação pode ser mais lenta (Creasy, Bube et al., 2012).

Apesar do período de repouso após finalização do tratamento, os animais tratados com a menor dose recuperaram toda a capacidade de PDE, porém não apresentaram o restabelecimento da sua produção quando relacionado ao peso total do órgão (Kempinas, Suarez et al., 1998, Oliveira, Félix et al., 2015). Porém, as análises histopatológicas não mostraram alterações morfológicas na produção de espermatozoides, que justificariam uma diminuição de espermatozoides na contagem, por terem sido produzidos número excessivo de gametas defeituosos. Tão pouco as dosagens hormonais se mostram comprometidas, o que também afetaria a produção desta célula. De acordo com o exposto, os resultados demonstram que na avaliação tardia, os efeitos deletérios na produção de espermatozoides, deve ser avaliado num período maior que 10 semanas de repouso do tratamento, já que os resultados mostram uma melhora na produção, mas não em toda sua capacidade (tamanho).

Mesmo no segundo experimento, os resultados da motilidade espermática continuam mostrando significativas reduções dos espermatozoides do tipo A, com resultados similares aos encontrados no primeiro experimento, o que entra em conflito com os resultados de tempo de trânsito dos espermatozoides neste órgão, já que este parâmetro não apresentou diferença do grupo controle. Outros fatores são responsáveis pela motilidade nos espermatozoides, como algumas proteínas essenciais para esta função, ou seja, a redução da motilidade pode ter sido ocasionada por outro fator de alteração que não foi avaliada neste estudo. Isto sugere que outros trabalhos possam ser desenvolvidos para desvendar melhor este fato (Amaral, Paiva et al., 2014, Vicens, Lüke et al., 2014). Porém se compararmos esses resultados com o primeiro experimento, é possível elucidar que a reversão dos efeitos deletérios pode ocorrer, mas demanda um período de tempo maior que o esperado neste trabalho. No entanto, o número de espermatozoides no epidídimo continuou diminuído, o que ainda implicaria numa redução da qualidade espermática (Fernandez, Porto et al., 2008).

Diferente do primeiro experimento, a morfologia na avaliação tardia não apontou nenhuma diferença entre os grupos tratados e o grupo controle, o que

sugere uma melhora na qualidade morfológica espermática após um tempo de suspensão do tratamento com estanozolol.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados foi possível concluir que o estanozolol está ligado à redução da qualidade espermática e infertilidade em machos durante o uso deste EAA. As alterações parecem ser revertidas, parcialmente, após o período de tratamento, no entanto, alguns parâmetros, de extrema importância para a qualidade espermática, permaneceram com alterações significativas apontando uma leve melhora nos seus resultados. Assim, evidenciam a necessidade de nova pesquisa com maior tempo de repouso para confirmar os fatos. Diante desses fatos, esses resultados suscitam preocupação quanto ao uso desregulado deste medicamento pelos homens.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M. A. (2015). "Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway." *Toxicol Appl Pharmacol* **282**(3): 285-296.
- Amaral, A., C. Paiva, C. Attardo Parrinello, J. M. Estanyol, J. L. Ballecà, J. Ramalho-Santos and R. Oliva (2014). "Identification of Proteins Involved in Human Sperm Motility Using High-Throughput Differential Proteomics." *Journal of Proteome Research* **13**(12): 5670-5684.
- Ames, J. and D. Z. Souza (2012). "Counterfeiting of drugs in Brazil." *Rev Saude Publica* **46**(1): 154-159.
- Angell, P., N. Chester, D. Green, J. Somauroo, G. Whyte and K. George (2012). "Anabolic steroids and cardiovascular risk." *Sports Med* **42**(2): 119-134.
- Bahrke, M. S., C. E. Yesalis, A. N. Kopstein and J. A. Stephens (2000). "Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents." *Sports Med* **29**(6): 397-405.
- Blanchard, T. L., R. G. Elmore, R. S. Youngquist, W. E. Loch, D. K. Hardin, C. J. Bierschwal, V. K. Ganjam, J. M. Balke, M. R. Ellersieck, L. J. Dawson and W. S. Miner (1983). "The effects of stanozolol and boldenone undecylenate on scrotal width, testis weight, and sperm production in pony stallions." *Theriogenology* **20**(1): 121-131.
- Carlini, E. A. G., J.C.; Noto, A.R.; Carlini, C.M.; Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. (2007). "II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas

psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005." Páginas & Letras **01**: 472.

Castro Martins, M., M. J. Peffers, K. Lee and L. M. Rubio-Martinez (2018). "Effects of stanozolol on normal and IL-1beta-stimulated equine chondrocytes in vitro." BMC Vet Res **14**(1): 103.

Creasy, D., A. Bube, E. de Rijk, H. Kandori, M. Kuwahara, R. Masson, T. Nolte, R. Reams, K. Regan, S. Rehm, P. Rogerson and K. Whitney (2012). "Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system." Toxicol Pathol **40**(6 Suppl): 40s-121s.

Cunha, T. S., N. S. Cunha, M. J. C. S. Moura and F. K. Marcondes (2004). "Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **40**: 165-179.

de Souza, G. L. and J. Hallak (2011). "Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review." BJU Int **108**(11): 1860-1865.

Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Exogenous Androgens and Male Reproduction." Adv Exp Med Biol **1034**: 25-28.

Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents." Adv Exp Med Biol **1034**: 13-24.

Ellis, H. and V. Mahadevan (2014). "Scrotum, testis and epididymis." Surgery (Oxford) **32**: e9-e16.

Evans, N. A. (2004). "Current concepts in anabolic-androgenic steroids." Am J Sports Med **32**(2): 534-542.

Fernandez, C. D., G. S. Fernandes, A. P. Favareto, J. E. Perobelli, M. Sanabria and W. D. Kempinas (2017). "Decreased Implantation Number After In Utero Artificial Insemination Can Reflect an Impairment of Fertility in Adult Male Rats After Exogenous Leptin Exposure." Reprod Sci **24**(2): 234-241.

Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." Int J Androl **31**(4): 427-437.

Filler, R. (1993). Male reproductive toxicology.

Garcia, M. C., V. K. Ganjam, T. L. Blanchard, E. Brown, K. Hardin, R. G. Elmore, R. S. Youngquist, W. E. Loch, M. R. Eilersieck and J. M. Balke (1987). "The effects of stanozolol and boldenone undecylenate on plasma testosterone and gonadotropins and on testis histology in pony stallions." Theriogenology **28**(1): 109-119.

Haupt, H. A. (1993). "Anabolic steroids and growth hormone." Am J Sports Med **21**(3): 468-474.

Iriart, J. A., J. C. Chaves and R. G. Orleans (2009). "[Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders]." Cad Saude Publica **25**(4): 773-782.

Kanayama, G., A. J. Gruber, H. G. Pope, Jr., J. J. Borowiecki and J. I. Hudson (2001). "Over-the-counter drug use in gymnasiums: an underrecognized substance abuse problem?" Psychother Psychosom **70**(3): 137-140.

Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman and G. R. Klinefelter (1998). "Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 890-896.

Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. F. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman, M. G. Narotsky, S. D. Perreault, D. P. Evenson, D. D. Ricker and G. R. Klinefelter (1998). "Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 897-904.

Kim, J. Y. and R. I. Wood (2014). "Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats." Horm Behav **66**(4): 585-590.

- Klinefelter, G. (2002). Actions of Toxicants on the Structure and Function of the Epididymis: 353-369.
- Klinefelter, G. R., J. W. Laskey, S. D. Perreault, J. Ferrell, S. Jeffay, J. Suarez and N. Roberts (1994). "The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis." J Androl **15**(4): 318-327.
- Lindstrom, M., A. L. Nilsson, P. L. Katzman, L. Janzon and J. F. Dymling (1990). "Use of anabolic-androgenic steroids among body builders--frequency and attitudes." J Intern Med **227**(6): 407-411.
- McLachlan, R. I., N. G. Wreford, C. Tsonis, D. M. De Kretser and D. M. Robertson (1994). "Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat." Biol Reprod **50**(2): 271-280.
- Mohd Mutalip, S. S., G. K. Surindar Singh, A. Mohd Shah, M. Mohamad, V. Mani and S. N. Hussin (2013). "Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol." Iran J Reprod Med **11**(8): 653-658.
- Moraes, T. P. B. (2015). "Anabolizantes nas buscas da WEB. Um estudo sobre o interesse sazonal por esteroides no Brasil." RJLB: 1979-2007.
- Oduwole, O. O., H. Peltoketo and I. T. Huhtaniemi (2018). "Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis." Front Endocrinol (Lausanne) **9**: 763.
- Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aida and T. Miura (2007). "Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*1." Biology of Reproduction **77**(6): 970-977.
- Oliveira, N. N. P. M., M. A. R. Félix, T. C. S. Pereira, L. G. P. Rocha, J. R. Miranda, M. G. Zangeronimo, J. E. B. P. Pinto, S. K. V. Bertolucci and R. V. d. Sousa (2015). "Sperm Quality and Testicular Histomorphometry of Wistar Rats Supplemented with Extract and Fractions of Fruit of *Tribulus terrestris* L." Brazilian Archives of Biology and Technology **58**: 891-897.
- Ozcagli, E., M. Kara, T. Kotil, P. Fragkiadaki, M. N. Tzatzarakis, C. Tsitsimpikou, P. D. Stivaktakis, D. Tsoukalas, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis and B. Alpertunga (2018). "Stanozolol administration combined with exercise leads to decreased telomerase activity possibly associated with liver aging." International Journal of Molecular Medicine **42**(1): 405-413.
- Phillips, D. M. (1972). "Comparative analysis of mammalian sperm motility." J Cell Biol **53**(2): 561-573.
- Ramaswamy, S. and G. F. Weinbauer (2014). "Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone." Spermatogenesis **4**(2): e996025.
- Robaire, B. and M. Hamzeh (2011). "Androgen action in the epididymis." J Androl **32**(6): 592-599.
- Robaire, B., B. T. Hinton and M.-C. Orgebin-Crist (2006). CHAPTER 22 - The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). J. D. Neill. St Louis, Academic Press: 1071-1148.
- Robb, G. W., R. P. Amann and G. J. Killian (1978). "Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats." J Reprod Fertil **54**(1): 103-107.
- Russell, L. D., R. A. Ettlin, A. P. S. Hikim and E. D. Clegg (1993). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." International Journal of Andrology **16**(1): 83-83.
- Russell, L. D., H. P. Ren, I. Sinha Hikim, W. Schulze and A. P. Sinha Hikim (1990). "A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell." Am J Anat **188**(1): 21-30.

- Sairam, M. R. and H. Krishnamurthy (2001). "The Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis: Lessons from Knockout Animal Models." Archives of Medical Research **32**(6): 601-608.
- Seed, J., R. E. Chapin, E. D. Clegg, L. A. Dostal, R. H. Foote, M. E. Hurtt, G. R. Klinefelter, S. L. Makris, S. D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K. A. Treinen, D. N. Veeramachaneni and L. D. Wise (1996). "Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation." Reprod Toxicol **10**(3): 237-244.
- Shokri, S., M. Hemadi, G. Bayat, M. Bahmanzadeh, I. Jafari-Anarkooli and B. Mashkani (2014). "Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa." Andrologia **46**(2): 184-190.
- Silva, L. S. M. F. and R. L. d. M. Moreau (2003). "Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **39**: 327-333.
- Silva, P. R. P. d., R. Danielski and M. A. Czepielewski (2002). "Esteróides anabolizantes no esporte." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **8**: 235-243.
- Silva, P. R. P. d., L. C. Machado Júnior, V. C. Figueiredo, A. P. Cioffi, M. C. Prestes and M. A. Czepielewski (2007). "Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **51**: 104-110.
- Snyder, P. J. (1984). "Clinical use of androgens." Annu Rev Med **35**: 207-217.
- Street, C., J. Antonio and D. Cudlipp (1996). "Androgen use by athletes: a reevaluation of the health risks." Can J Appl Physiol **21**(6): 421-440.
- Tyl, R. W. (2002). "In vivo models for male reproductive toxicology." Curr Protoc Toxicol **Chapter 16**: Unit16.11.
- Vicens, A., L. Lüke and E. R. Roldan (2014). "Proteins involved in motility and sperm-egg interaction evolve more rapidly in mouse spermatozoa." PLoS One **9**(3): e91302.
- Walker, W. H. (2011). "Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis." Spermatogenesis **1**(2): 116-120.
- Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (1995). "Anabolic-androgenic steroids. Current issues." Sports Med **19**(5): 326-340.
- Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (2000). "Doping among adolescent athletes." Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **14**(1): 25-35.
- Yesalis, C. E., N. J. Kennedy, A. N. Kopstein and M. S. Bahrke (1993). "Anabolic-androgenic steroid use in the United States." Jama **270**(10): 1217-1221.

Capítulo III

**Os Efeitos Deletérios Reprodutivos do Decanoato de
Nandrolona se Agravam Após Interrupção do Tratamento em
Ratos**

Os Efeitos Deletérios Reprodutivos do Decanoato de Nandrolona se Agravam Após Interrupção do Tratamento em Ratos

Deus Junior RS^{1,2}, Rosa JL³, Figueiredo TM³, Dolder MAH¹

¹Universidade de Campinas – UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, Brasil

²Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Os andrógenos são hormônios masculinos responsáveis pelos efeitos androgênicos e anabólicos nos homens. Efeito androgênico é o desenvolvimento das características masculinas e o efeito anabólico é o aumento de massa magra e diminuição de gordura. Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são medicações derivadas, geralmente, da molécula da testosterona e possuem os mesmos benefícios, por isso, o uso destas substâncias está cada vez maior entre esportistas amadores e profissionais. O decanoato de nandrolona (DN) é um dos EAAs mais utilizados atualmente, sendo necessário avaliar as reais ações deste medicamento na saúde reprodutiva masculina. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade reprodutiva do decanoato de nandrolona em ratos Wistar em dois momentos: avaliação imediata (logo após o final do tratamento) e avaliação tardia (após repouso do tratamento por 70 dias). **Métodos:** 21 ratos foram divididos em 3 grupos: CN o grupo controle (tratado com óleo vegetal), N5 recebeu a dosagem de 5mg/Kg de DN e N10 recebeu 10mg/Kg, para realização da avaliação imediata. Após eutanásia, técnicas de qualidade espermática, histologia, morfometria e de dosagens hormonais, foram realizadas. Ainda, 10 machos e 30 fêmeas foram utilizados para a técnica de inseminação artificial intrauterina (IA). Para a avaliação tardia, outros 21 ratos foram tratados e após repouso do tratamento sofreram eutanásia e alguns parâmetros analisados anteriormente foram refeitos, para avaliar a recuperação dos possíveis efeitos deletérios. **Resultados:** Na avaliação imediata, próstata, epidídimo e testículo foram diminuídos em N5. N10 apresentou aumento no peso da vesícula seminal cheia e vazia e diminuição do peso relativo do epidídimo. Na contagem de espermatozoides no epidídimo, verificou-se os dois grupos com número reduzido na cabeça/corpo e no grupo N5 na cauda deste órgão. Todos os grupos tiveram aumento de espermatozoides do tipo C (imóveis). Na IA, os dois grupos apresentaram diminuição do potencial fértil e aumento da perda pré-implantação. Ainda, foi possível observar significativo aumento de túbulos seminíferos anormais com o aparecimento de células acidófilas e vacuolizações. Na avaliação tardia, houve redução do peso de órgãos ligados à reprodução (próstata, vesícula, epidídimo e testículo) e também diminuição dos níveis séricos de testosterona, testosterona intratesticular e LH. Apresentaram diminuição da contagem espermática em todas as partes do epidídimo e diminuição do trânsito espermático neste órgão. E ainda, o grupo tratado com a menor dose, mantém o aumento de células acidófilas nos túbulos seminíferos. **Conclusão:** O DN pode ter ligação com a infertilidade masculina, sendo que em doses altas o efeito pode aparecer tardiamente, ou seja, após o encerramento do tratamento com a medicação.

INTRODUÇÃO

Os andrógenos são os hormônios sexuais masculinos responsáveis pela caracterização dos machos e o desempenho das funções celulares e fisiológicas do sexo masculino. Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são medicamentos sintéticos derivados dos andrógenos e utilizados para o tratamento de várias doenças, porém, também pode ser utilizado para melhorar a estética corporal, devido as ações anabólicas que eles podem causar (Andrade, Simao et al., 2018, Fink, Schoenfeld et al., 2018). O efeito anabólico mais comum causado pelo uso de EAAs é a hipertrofia, ou seja, o aumento na massa magra que pode acontecer pelo aumento da síntese de proteínas, o aumento da fixação de nitrogênio e a diminuição do catabolismo de proteínas, efeitos do uso deste tipo de medicação, por isso mesmo estes medicamentos são utilizados na terapia clínica para ajudar em doenças que causam a debilidade muscular nos indivíduos (Maravelias, Dona et al., 2005, Do Carmo, Fernandes et al., 2011).

O decanoato de nandrolona (DN), comercializado como deca-durabolin, é um anabolizante muito utilizado na prática do fisiculturismo, em atletas profissionais e frequentadores de academias, pelos seus efeitos anabólicos, melhorando sua performance e aparência corporal (Shokri, Hemadi et al., 2014, Ahmed, 2015, Min and Lee, 2018).

A livre comercialização de EAAs é proibida em vários países; no Brasil, por exemplo, é restrita e somente autorizada mediante prescrição médica. Porém a facilidade da comercialização em outros países, facilita a venda deste tipo de medicação de forma ilegal nos países com uso controlado (Ames and Souza, 2012, Moraes, 2015).

Trabalhos brasileiros com dados epidemiológicos acerca do consumo de anabolizantes são escassos, porém, pesquisas regionais apontam que pelo menos 2% dos alunos em idade escolar já fizeram uso deste tipo de medicação. Enquanto que nos Estados Unidos da América, o valor divulgado em trabalhos científicos, fica em torno de aproximadamente 3% dos jovens (Evans, 2004, Iriart, Chaves et al., 2009, Venâncio, Nóbrega et al., 2010).

As pesquisas experimentais são muito utilizadas em trabalhos de avaliações toxicológicas. Porém, quando se trata de anabolizantes e reprodução masculina a literatura é escassa (Ahmed, 2015). Quanto ao DN, alguns efeitos no aparelho reprodutor masculino já foram descritos, como por exemplo a possibilidade do anabolizante causar danos no DNA dos espermatozoides (Shokri, Hemadi et al., 2014). A combinação de exercícios e a dose supra-fisiológica de DN pode aumentar a apoptose em células espermatozoides (Shokri, Aitken et al., 2010) e ainda, altas doses deste EAA reduz o volume dos testículos e o tamanho dos túbulos seminíferos (Noorafshan, Karbalay-Doust et al., 2005). Entretanto, os reais efeitos nos testículos não estão bem elucidados (Ahmed, 2015).

Assim, este trabalho tem como finalidade avaliar o impacto na reprodução, bem como na qualidade espermática e fertilidade dos machos tratados com decanoato de nandrolona por um período de 10 semanas e também avaliar se ocorre a recuperação das alterações após a suspensão do uso, após 70 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para este experimento foram utilizados ratos adultos (n= 52) e ratas (n=30) da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, com 45 dias. Os animais desta pesquisa são oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Todos os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (43cm x 30cm x 15cm) com maravalha autoclavada. Na sala onde os animais foram acondicionados a temperatura foi controlada ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) por termostato, ainda, tiveram acesso irrestrito a água e ração para roedores (Presence). Os ratos tiveram um período de adaptação ambiental de 30 dias antes de iniciar os testes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal (CEUA) da UNESP, Botucatu/SP, com o número de protocolo 938.

Desenho experimental

De início, foi realizada a avaliação imediata, onde 21 ratos adultos com 75 dias e pesando aproximadamente 250g, foram divididos em 3 grupos com 7 ratos

em cada grupo: CN foi o grupo tratado com óleo de milho, N5 representou os animais tratados com 5mg/kg e N10 os com 10mg/kg de decanoato de nandrolona diluídos em óleo milho. Os ratos foram tratados semanalmente através de injeção intramuscular pelo período de 70 dias.

O número sobressalente de ratos (n=10) foram mantidos nas mesmas condições, porém não receberam tratamento, quando completaram 90 dias de vida, eles foram vasectomizados para a estimulação do útero das fêmeas (n=30) na técnica de inseminação artificial intrauterina. As fêmeas foram mantidas em sala diferente, com ciclo reverso, 2 semanas antes da inseminação.

Na avaliação tardia, ratos (n=21), foram divididos e tratados do mesmo modo que na avaliação imediata, com a diferença que os animais ficaram 70 dias sem receber tratamentos (repouso) para avaliação da possível recuperação dos efeitos deletérios, este período é referente ao tempo de renovação do ciclo espermático.

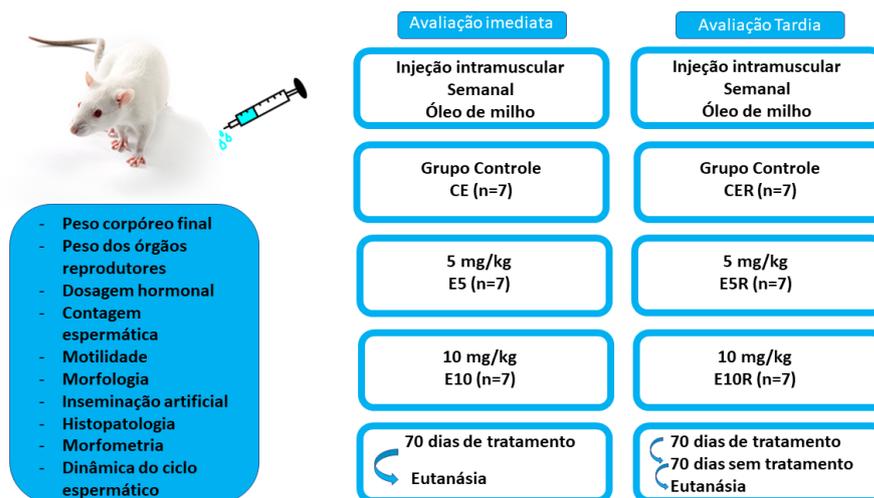


Figura 1. Esquema dos tratamentos e avaliações realizadas.

Eutanásia e coleta de amostras (órgãos, sangue e sêmen)

No dia seguinte ao final do tratamento, os animais foram pesados e eutanasiados em câmara de CO₂, seguido por punção cardíaca. Após abertura abdominal, órgãos reprodutores foram coletados e pesados (testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata). O sangue total coletado foi dispensado em tubos a vácuo, centrifugados e tiveram as amostras de soro congeladas, para em outra

ocasião, ser realizada a dosagem hormonal sérica dos hormônios LH, FSH, progesterona e testosterona.

Para coleta de amostra de sêmen, o epidídimo esquerdo foi removido e a região da cauda deste órgão foi perfurada através da técnica de *poking*, a perfuração ocorreu em meio HTF (*human tubal fluid*). O sêmen coletado foi utilizado na realização das técnicas de inseminação artificial intrauterina e motilidade espermática. Ainda, uma fração da cauda do epidídimo foi congelada a -20°C para determinar a morfologia espermática, contagem espermática e o tempo de trânsito neste órgão. O testículo esquerdo foi removido, descapsulado e centrifugado para coleta do fluido testicular, que foi congelado a -4°C para análise de dosagem hormonal de testosterona intratesticular, enquanto o parênquima foi utilizado para contagem espermática e produção diária de espermatozoides. O testículo direito foi pesado e mantido em fixador (Bouin), para no futuro ser processado histologicamente, cortados ($5\mu\text{m}$) e corados (H&E) e mantidos em lâminas histológicas permanentes para em outra ocasião serem realizadas as análises histopatológicas, dinâmica da espermatogênese e morfometria dos túbulos seminíferos.

Dosagens dos hormônios testosterona, progesterona, FSH, LH e testosterona intratesticular

O soro resultante do dia da eutanásia foi utilizado para dosagem dos hormônios testosterona, progesterona, hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante e o fluido testicular proveniente do testículo direito para análise de testosterona intratesticular. Nesta avaliação as amostras foram processadas pela técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP. As dosagens de progesterona e testosterona (sérica e intratesticular) foram mensuradas através do kit Coat-a-Count® assay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA), enquanto as concentrações de FSH e LH, foram obtidas através de kits específicos fornecidos pelo National Institute of Arthritis and Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK). As amostras foram avaliadas no mesmo ensaio para

evitar erros inter-ensaios. As variabilidades intra-ensaio foram de 3,4% para LH, 2,6% para progesterona, 2,8% para FSH e 4% para testosterona.

Contagem espermática no testículo (produção diária espermática) e no epidídimo (tempo de trânsito).

Neste teste, o parênquima proveniente do testículo esquerdo, foi descongelado sob gelo, homogeneizado em 5mL de solução de salina(0.9%)+triton-X100(0,05%)+mertiolate(0,01%) (STM). Ainda a amostra foi diluída em solução STM (100µL amostra + 900µ de STM), para então ser processado em sonificador por 30 s. Após este processo, aproximadamente 20µL foram dispostos em duas câmaras de Neubauer e foram analisados 5 campos de cada câmara em microscópio óptico Leica® no aumento de 400x. Para calcular o número de espermátides maduras e a PDE foi utilizado o mesmo método de Robb et al. (1978). As duas divisões de regiões do epidídimo (cauda e cabeça/corpo) tiveram o mesmo processamento para a realização da contagem espermática. Para estimar o tempo de trânsito dos espermatozoides neste órgão, foi dividido o número de espermatozoides em cada região do epidídimo pela PDE.

Motilidade espermática

Para classificação dos espermatozoides quanto a sua motilidade, o sêmen proveniente do *poking* da cauda do epidídimo esquerdo foi homogeneizado em meio HTF e uma câmara Makler foi montada com cerca de 10µL de amostra para leitura em microscópio óptico da marca Leica®, no aumento de 400x. Ao todo, 100 gametas masculinos foram contabilizados e classificados quanto à motilidade em: espermatozoides do tipo A, móvel com trajeto progressivo; tipo B, móvel sem projeto progressivo e tipo C, imóvel.

Morfologia espermática

Espermatozoides provenientes do *poking* do epidídimo e conservados em solução de formol tamponado, também passaram pela avaliação de morfologia

dessas células. Para analisar a morfologia espermática, esfregaços foram preparadas e coberta com lamínulas. Após o período de aproximadamente 90 minutos foram analisadas em microscópio de contraste de fase e 100 espermatozoides foram classificados quanto a anormalidades de cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete e isolada), cauda (enrolada, quebrada, dobrada ou dupla) ou, na ausência dessas alterações morfológicas, foram avaliados como normais. Ainda, os espermatozoides foram avaliados quanto a presença ou ausência de gota citoplasmática.

Técnica de inseminação artificial intrauterina (in utero)

Levando em consideração que os ratos produzem e ejaculam uma quantidade elevada de espermatozoides e proporcionar maior sensibilidade para a avaliação de fertilidade, a técnica de inseminação artificial intrauterina (IA) foi realizada, já que com a realização desta técnica, o número de espermatozoides inseminados em cada corno uterino é pré-estabelecido e semelhante, dando assim, condições de igualdade para a fecundação dos ovócitos liberados em cada corno do útero das ratas (Klinefelter, Welch et al., 2002, Fernandez, Fernandes et al., 2017). Para realizar esta técnica foram utilizadas 30 fêmeas, dessas apenas 21 fêmeas, que estavam receptivas (no dia do experimento) aos machos previamente vasectomizados (cauterização de ductos deferentes) e com limpeza dos ductos espermáticos realizada (sem espermatozoides), foram escolhidas para a realização da técnica de inseminação artificial *in utero*. Para realização desta técnica os espermatozoides são provenientes da técnica de *poking* e são diluídos em meio HTF na proporção de 1/10 foram contados em câmara de Neubauer e injetados 5×10^6 espermatozoides em cada corno uterino (Klinefelter, Laskey et al., 1994, Kempinas, Suarez et al., 1998). Cada fêmea recebeu, após exposição do corno uterino por abertura abdominal, os espermatozoides de um rato dos grupos tratados e depois seu abdômen foi suturado. Foram mantidas isoladamente em gaiolas e monitoradas várias vezes durante o dia. Após 20 dias, essas mesmas fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO₂, seguida por decapitação para a realização da coleta de parâmetros relativos à fertilidade. No ovário, o peso do órgão e número de corpos lúteos foi avaliado. No útero, o número de reabsorções, de implantes e de fetos,

bem como o peso do órgão e dos fetos também foi mensurado. Frente a esses resultados, foi possível definir o potencial fértil (eficiência das implantações): número de implantações/número de corpos lúteos $\times 100$; a taxa de prenhez: número de fêmeas prenhes / número de fêmeas inseminadas $\times 100$; taxa de perda de pré-implantação: (número de corpos lúteos-número de implantes/número de corpos lúteos) $\times 100$ e a taxa de perda pós-implantação: (número de implantes-número de fetos vivos)/números de implantes $\times 100$.

Esta técnica somente foi realizada na avaliação imediata, já que a política dos 3 “Rs”, reduzir, reciclar e reutilizar, foi contemplada neste estudo e ainda levando em consideração o entendimento que se ocorresse o aumento da qualidade espermática aumentaria as taxas avaliativas de fertilidade e o contrário também seria verdadeiro.

Avaliação histopatológica

Nas secções de testículos já coradas, a avaliação histopatológica foi realizada analisando 100 secções de túbulos seminíferos randomizados, observando o aspecto do epitélio, conteúdo da luz e interstício dos testículos, de forma que possíveis lesões morfológicas desses órgãos fossem classificadas (Foley, 2001). Os túbulos foram classificados como anormais (mediante presença de células acidófilas, vacuolização, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares e esfoliação de células na luz) ou normais (presença de concêntrica e normal organização das células germinativas), as análises foram realizadas através de microscópio de óptico Leica® (400X).

Avaliação morfométrica dos testículos

Para avaliação do diâmetro dos túbulos seminíferos e da espessura do epitélio germinativo foram avaliadas dez secções de túbulos seminíferos por animal do grupo controle e tratado com decanoato de nandrolona no estágio IX da espermatogênese. Para tanto foi utilizado um microscópio Leica DMLB, aumento de 400X usando um analisador de imagem programa Leica Q-win software Versão 3 for Windows™.

Dinâmica da espermatogênese

Lâminas histológicas, coradas em H&E, com 3 secções de cortes do testículo dos ratos foram avaliados e seus túbulos seminíferos foram analisados e classificados quanto ao estágio do ciclo da espermatogênese o túbulo se encontrava: estágio I-VI (duas gerações de espermátides), estágio VII-VIII (espermátide madura), estágio IX-XIII (somente uma geração de espermátide) e estágio XIV (presença de espermatócito secundário). Foram analisados 100 túbulos entre as 3 secções e a frequência relativa dos estágios foi estimada.

Análise estatística.

As análises de resultados de diferentes parâmetros entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido por Tukey ou Dunnett, respectivamente, de acordo com a definição da variável ser paramétrica ou não paramétrica. Ainda, para avaliar a associação entre variáveis qualitativas, o teste chi-quadrado de Pearson foi o usado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$. Estas análises foram conduzidas no GraphPad Prism (6.00).

RESULTADOS

Avaliação imediata

Como resultado, foi encontrado que o peso da próstata ventral apresentou redução no grupo tratado com menor dose, tanto em seu peso absoluto quanto em seu peso relativo, enquanto o grupo N10 não apresentou diferença em relação ao grupo controle. A vesícula seminal (cheia e vazia) mostrou peso superior ao do grupo controle em N10, mas quando comparado o peso relativo, o aumento não se repetiu. O peso absoluto do epidídimo apresentou redução em N5, porém quando levado em consideração o peso relativo deste órgão, ambos os grupos tratados mostraram resultados inferiores à média do grupo controle. No testículo, somente o grupo tratado com a menor dose, mostrou redução do peso (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corpóreo final e peso de órgãos reprodutores

Parâmetro	CN	N5	N10
Peso final (g)	443,20±19,16	491,30±19,13	483,20±23,36
Próstata ventral (mg)	501,20±94,20	257,90±44,90**	574,70±63,30
Próstata ventral relativa (mg/100g)	110,70±17,89	51,40±7,52**	119,00±12,09
Vesícula seminal cheia (mg)	888,30±122,70	721,20±70,84	1290,00±125,00*
Vesícula seminal cheia relativa (mg/100g)	199,10±25,18	146,00±10,82	270,70±30,52
Vesícula seminal vazia (mg)	397,50±48,64	330,10±37,10	562,10±45,39*
Vesícula seminal vazia (mg/100g)	89,12±9,73	66,31±5,35	117,00±9,68
Epidídimo (mg)	660,70±33,01	480,80±38,76**	581,40±30,66
Epidídimo (mg/100g)	150,10±7,96	98,62±8,38***	121,00±5,68*
Testículo (g)	1,78±0,05	1,41±0,15*	1,70±0,07
Testículo relativo (mg/100g)	407,40±23,04	298,80±32,31**	355,10±15,42

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001. Teste análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

Na figura 2, estão expostos os resultados referentes às dosagens hormonais, que mostram que não houve alteração nas concentrações dos hormônios avaliados.

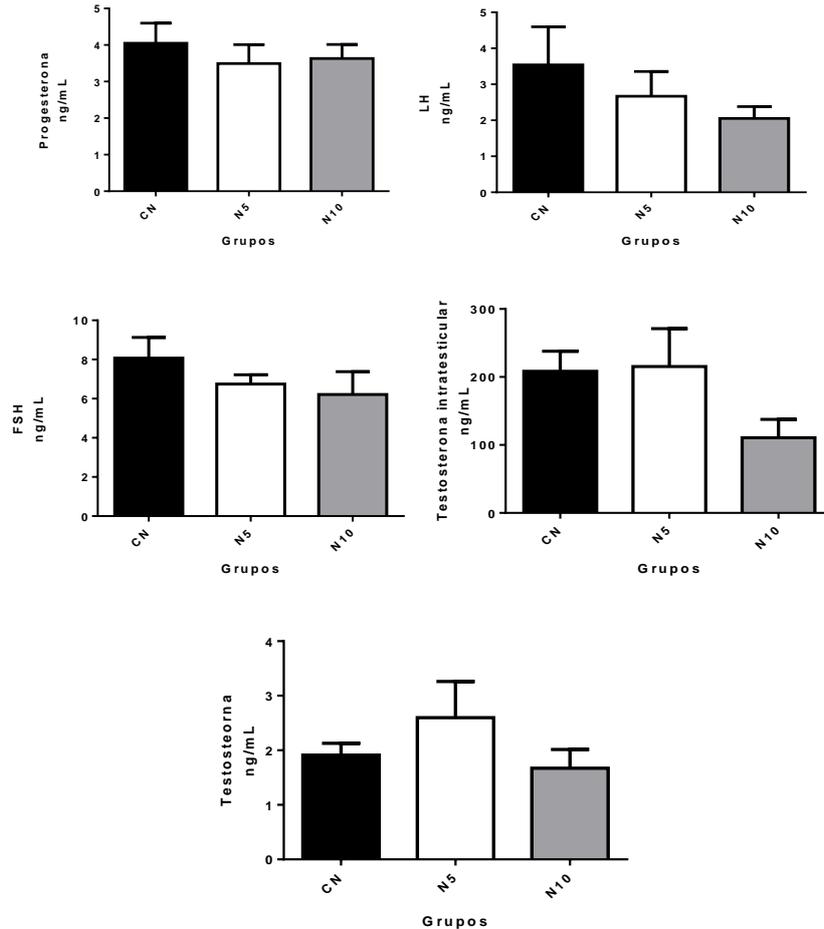


Figura 2. Concentrações séricas e intratesticular de hormônios. Teste análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett, $p \geq 0,05$.

Na tabela 2, são demonstrados os resultados da contagem espermática testicular, e pode ser observado que não houve redução no número de espermátides maduras e nem na PDE nos animais tratados com o esteroide anabolizante estudado. Na contagem epididimária, os dois grupos tratados apresentaram reduções do número de espermatozoides na cabeça-corpo e somente o grupo N5 mostrou número de espermatozoides estatisticamente inferior ao grupo controle na cauda deste órgão.

Tabela 2. Contagem espermática e tempo de trânsito espermático.

Parâmetros	CN	N5	N10
<i>Contagem espermática testicular</i>			
Espermátides (x10⁶/testículo)	157,90±20,28	107,10±18,17	151,90±16,78
Espermátides (x10⁶/g/testículo)	109,40±13,19	98,24±18,81	104,20±10,33
Produção espermática (x10⁶/testículo/ diária)	25,89±3,32	17,56±2,97	24,90±2,75
Produção espermática (x10⁶/testículo/g/ diária)	17,94±2,16	16,11±3,08	17,08±1,69
<i>Contagem espermática epididimária</i>			
<i>Cabeça/corpo</i>			
Nº de espermatozoides (x10⁶/órgão)	135,40±13,72	81,70±20,85*	76,50±7,59*
Tempo de trânsito espermático (dias)	5,65±0,71	4,24±1,09	3,20±0,38
<i>Cauda</i>			
Nº de espermatozoides (x10⁶/órgão)	213,90±25,39	92,86±20,84**	173,90±29,60
Tempo de trânsito espermático (dias)	8,92±1,22	6,84±1,47	8,97±1,62

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01.
 Teste análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

Quanto a motilidade, fator importante para avaliar a qualidade espermática, foi observado que houve uma diminuição dos espermatozoides do tipo A (móvel, com movimento progressivo) e aumento de gametas masculinos do tipo C (imóvel), em ambos os grupos tratados (Figura 3).

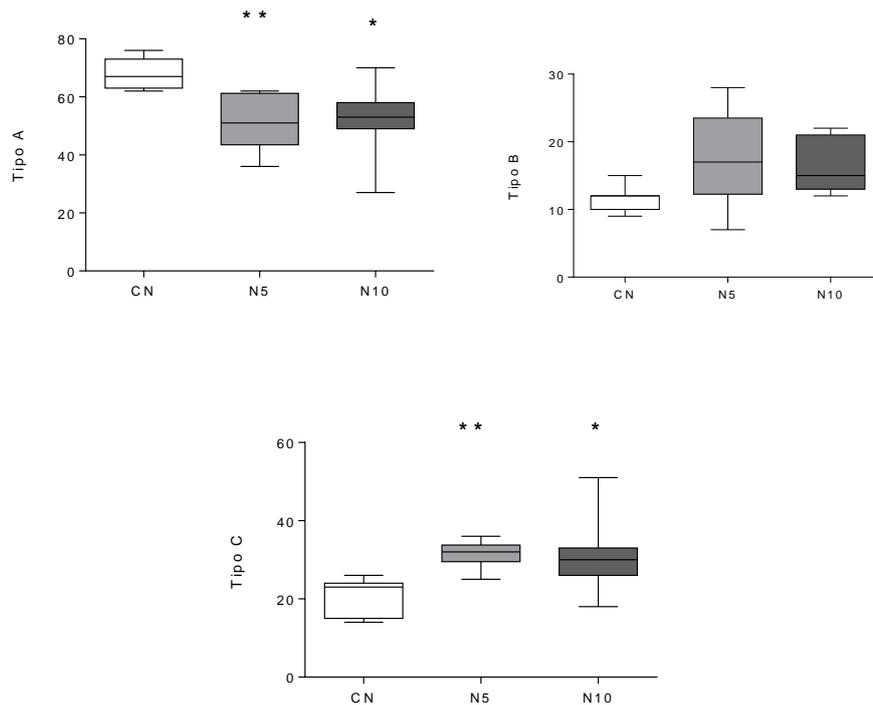


Figura 3. Motilidade espermática. Valores expressos como mediana (1º quartil - 3º quartil), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

Na morfologia espermática, não foram observadas significâncias estatísticas entre os grupos tratados e o controle na quantidade de espermatozoides normais, como pode ser observado na tabela 3. Contudo, em N5, apresentou redução nas anormalidades de cabeça. A gota citoplasmática não mostrou alterações nos grupos estudados.

Tabela 3. Morfologia espermática

Parâmetros	CN	N5	N10
Espermatozoides normais (%)	92,50 (86,00-96,50)	97,50 (91,50-99,00)	95,50 (88,00-99,50)
Espermatozoides anormais (%)			
Anormalidade de cabeça	6,00 (3,00-7,00)	0,50 (0,00-3,50)*	3,00 (0,50-8,50)
Anormalidade de cauda	1,00 (0,50-4,00)	1,00 (0,00-1,50)	1,50 (0,50-2,00)
Gota citoplasmática	24,00(12,00-31,50)	22,00(16,50-31,00)	35,00(27,00-50,00)

Valores expressos como mediana (1º quartil - 3º quartil), * $p \leq 0,05$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

A tabela 4 expõe os resultados da laparotomia após inseminação artificial *in utero* e mostra que a taxa de prenhez foi estatisticamente reduzida no grupo N10. O potencial fértil também foi reduzido nos grupos que receberam o anabolizante e ambos os tratamentos tiveram dados estatisticamente significantes, com destaque para a menor dose, que apresentou valor de $p \leq 0,001$.

Quanto às perdas pré-implantação, também houve aumento significativo em N5 e N10, com a menor dose tendo o valor de $p \leq 0,001$. Houve aumento estatisticamente significativo nas perdas pós-implantação, no grupo tratado com a maior dose de DN, enquanto o grupo que recebeu a menor dose apresentou resultado similar ao controle.

Tabela 4. Ensaio de fertilidade após inseminação artificial intrauterina.

Parâmetros	CN	N5	N10
Taxa de prenhez (%)	100,00	71,40	57,14*
Potencial fértil (%)	81,81	57,70***	69,80*
Perda pré-implantação (%)	18,18	42,30***	30,18*
Perda pós-implantação (%)	11,10	14,60	45,90***

Valores expressos em porcentagem (teste chi-quadrado) * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Os resultados expressos na tabela 5, mostram que na avaliação histopatológica, ambos os grupos tratados apresentaram reduções nos números de túbulos seminíferos normais, aumento da incidência de células acidófilas, e em N10, ainda houve aumento significativo de vacuolizações. Quanto à dinâmica da espermatogênese e a morfometria dos túbulos seminíferos, não houve alterações nas comparações dos grupos tratados com o grupo controle.

Tabela 5. Avaliações histopatológicas, dinâmica espermatogênica e a morfometria tubular em ratos tratados com nandrolona

Parâmetros	CN	N5	N10
Túbulos seminíferos normais (%)¹	82,00 (77,75 – 85,25)	67,00 (63,50 – 72,75)*	66,50 (63,75 – 69,50)**
Túbulos seminífero com células acidófilas (%)¹	12,00 (9,50 – 14,75)	21,50 (18,50 – 25,25)*	22,50 (21,00 – 26,25)*
Túbulos seminíferos com vacuolização (%)¹	6,00 (5,00 – 6,50)	9,5 (8,00 – 13,00)	10,00 (8,00 – 12,00)*
Estágios I-VI (%)¹	42,00 (36,50 – 43,50)	42,50 (40,25 – 43,25)	40,50 (37,75 – 41,75)
Estágios VII-VIII (%)¹	16,50 (15,00 – 19,25)	15,00 (13,00 – 17,75)	20,50 (16,50 – 23,50)
Estágios IX-XIII (%)¹	38,00 (34,25 – 40,25)	36,00 (31,75 – 36,00)	34,00 (29,00 – 36,75)
Estágios XIV (%)¹	7,00 (5,50 – 8,50)	7,50 (6,75 – 9,25)	6,50 (4,75 – 7,25)
Altura do epitélio seminífero (µm)²	86,75±2,44	80,64±3,07	81,55±0,27
Diâmetro tubular (µm)²	278,00±6,41	276,90±4,65	276,30±6,21

Valores expressos em medianas e intervalos interquartil ¹ ou médias ± SEM ², *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001. One-way ANOVA seguido por Tukey ou teste de Dunnett, respectivamente.

Avaliação tardia

Objetiva analisar possíveis recuperações nas alterações dos resultados após o tratamento com DN ou ainda efeitos tardios do uso deste anabolizante.

Na tabela 6 é possível analisar o peso corporal e dos órgãos após a suspensão do tratamento por 70 dias. Foi observado que todos os órgãos reprodutores tiveram o peso diminuído em relação ao controle nos dois grupos tratados, mesmo quando analisados os pesos relativos dos órgãos.

Tabela 6. Peso corpóreo final e peso dos órgãos reprodutores 70 dias após suspensão do tratamento com DN.

Parâmetros	CNR	N5R	N10R
Peso Final (g)	402,40±18,82	395,20±12,61	402,80±6,35
Próstata ventral (mg)	593,00±62,03	82,29±12,45****	176,60±54,93****
Próstata ventral relativa (mg/100g)	125,70±8,81	16,53±2,68****	36,46±11,20****
Vesícula seminal cheia (mg)	1474±98,36	203,70±26,67****	273,70±41,06****
Vesícula seminal cheia relativa (mg/100g)	281,00±18,23	40,41±54,13****	57,00±8,52****
Vesícula seminal vazia (mg)	565,30,5±53,99	159,00±20,90****	203,00±13,07****
Vesícula seminal vazia (mg/100g)	106,50±6,89	31,46±4,49****	42,38±3,08****
Epidídimo (mg)	674,30±23,73	309,60±25,29****	381,30±34,36****
Epidídimo (mg/100g)	129,70±7,92	60,50±3,85****	79,72±7,97***
Testículo (g)	1,82±0,11	1,17±0,08***	1,19±0,08***
Testículo relativo (mg/100g)	349,90±25,33	229,90±11,82***	249,80±19,56**

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001. Teste análise de variância – ANOVA com *a posteriori* de Dunnett.

Quanto às dosagens hormonais, após período de recuperação, diferentemente do que foi observado na avaliação imediata, na avaliação tardia houve redução das concentrações séricas de LH, testosterona sérica e testosterona intratesticular em ambos os tratamentos. Enquanto as concentrações de progesterona e FSH não foram alteradas (Figura 4).

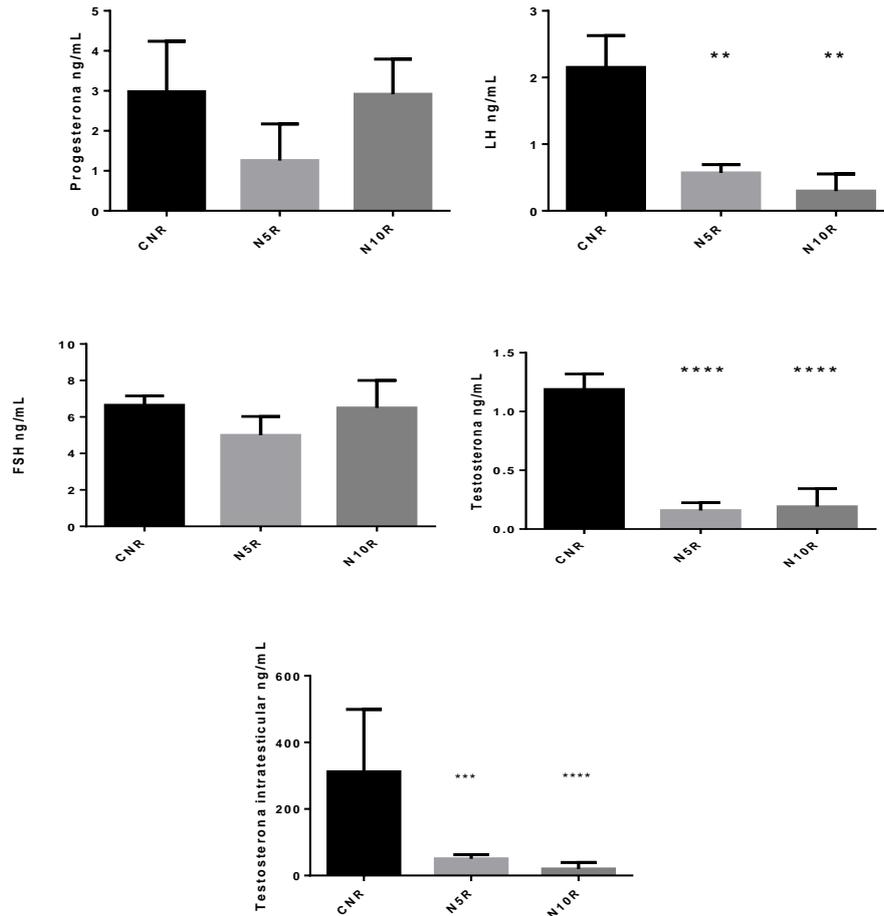


Figura 4. Concentrações séricas e intratesticular de hormônios, 70 dias após suspensão do tratamento com DN. Teste análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

Na contagem espermática testicular os resultados demonstram diminuições estatísticas no número de espermátides maduras e produção diária espermática (PDE), mas esses dados não se repetem quando são levados em consideração o peso do testículo, como pode ser visto na tabela 7. Ainda, na mesma tabela, na contagem epididimária, ficou evidente a diminuição significativa do número de espermatozoides e do trânsito dos espermatozoides, tanto na cabeça/corpo quanto na cauda, do epidídimo.

Tabela 7. Contagem espermática e tempo de trânsito espermático, 70 dias após suspensão do tratamento com DN.

Parâmetros	CNR	N5R	N10R
<i>Contagem espermática testicular</i>			
Espermátide (x10⁶/testículo)	246,10±23,04	153,20±8,71**	179,90±19,4*
Espermátide (x10⁶/g/testículo)	165,10±13,84	155,50±13,68	175,80±14,39
Produção espermática (x10⁶/testículo)	40,35±3,70	25,11±1,40**	24,49±3,19*
Produção espermática (x10⁶/g/testículo)	27,06±2,26	25,49±2,24	28,81±2,35
<i>Contagem espermática epididimária</i>			
<i>Cabeça/corpo</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/testículo)	174,00±17,78	34,39±10,02****	46,42±12,67****
Tempo de trânsito espermático (dias)	4,34±0,30	1,38±0,39****	1,60±0,44***
<i>Cauda</i>			
Número de espermatozoides (x10⁶/testículo)	292,50±21,34	30,74±11,12****	50,08±4,72****
Tempo de trânsito espermático (dias)	7,62±0,79	1,21±0,42****	1,86±0,31****

Valores expressos em média ± erro padrão da média, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001 Teste de análise de variância – ANOVA com a *posteriori* de Dunnett.

A análise de motilidade espermática na avaliação tardia, representada na figura 5, mostra que somente houve diminuições significativas na motilidade no grupo N5 nos espermatozoides do tipo A e B. Nos espermatozoides do tipo C, o aumento não foi estatisticamente significativo em nenhum dos grupos tratados.

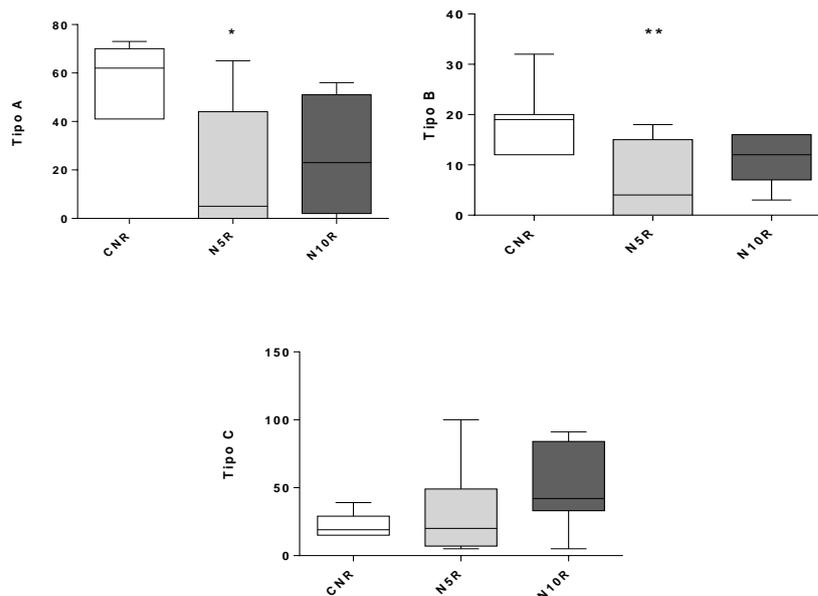


Figura 5. Motilidade espermática 70 dias após suspensão do tratamento com DN. Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

A morfologia espermática, na avaliação tardia, está expressa na tabela 8 e é possível observar que somente o grupo tratado com menor dose apresentou resultados diferentes do grupo controle, com diminuição da porcentagem de espermatozoides normais e aumento das anormalidades de cabeça.

Tabela 8. Morfologia espermática 70 dias após suspensão do tratamento com DN.

Parâmetros	CNR	N5R	N10R
Espermatozoides normais (%)	91,00(90,00-92,00)	77,00(58,00-82,00)*	85,50(68,00-89,00)
Espermatozoides anormais (%)			
Anormalidade de cabeça	2,00(0,00-6,50)	10,50(6,00-14,00)*	6,00(3,50-10,00)
Anormalidade de cauda	6,50(5,50-10,00)	9,00(8,00-36,00)	13,50(7,50-25,00)
Gota citoplasmática	32,00(19,50-33,50)	22,00(18,00-30,00)	24,00(21,00-35,00)

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), * $p \leq 0,05$. Teste Kruskal-Wallis com *a posteriori* de Dunnett.

Na avaliação dos resultados de histopatologia, foram encontradas reduções do número de túbulos seminíferos normais, com aumento de células acidófilas e de vacuolizações no grupo de animais tratados com a menor dose,

o grupo tratado com a maior dose, não obteve alterações estatisticamente significantes (Figura 6). A dinâmica da espermatogênese também não apresentou alterações nos grupos tratados. Já na morfometria dos túbulos seminíferos, em N5, foi encontrada uma redução significativa na altura do epitélio germinativo (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliações histopatológicas, dinâmica espermatogênica e morfometria tubular em ratos tratados com nandrolona 70 dias após suspensão do tratamento.

Parâmetros	CNR	N5R	N10R
Túbulos seminíferos normais (%)¹	79,00 (73,00 – 80,25)	67,00 (63,00 – 69,00)**	70,00 (67,00 – 72,00)
Túbulos seminífero com células acidófilas (%)¹	11,00 (10,00 – 13,00)	23,00 (21,25 – 26,50)**	17,00 (12,25 – 18,75)
Túbulos seminíferos com vacuolização (%)¹	5,00 (4,00 – 6,00)	9,00 (9,00 – 10,50)**	7,00 (6,00 – 8,50)
Estágios I-VI (%)¹	42,00 (39,50 – 44,25)	39,00 (37,00 – 41,75)	40,00 (39,50 – 43,25)
Estágios VII-VIII (%)¹	17,00 (15,50 – 20,50)	17,00 (16,00 – 19,00)	18,00 (17,25 – 19,00)
Estágios IX-XIII (%)¹	33,00 (31,75 – 38,00)	34,00 (30,50 – 36,75)	32,00 (29,75 – 36,50)
Estágios XIV (%)¹	8,00 (7,00 – 9,50)	8,00 (5,00 – 9,00)	7,00 (5,50 – 9,50)
Altura do epitélio seminífero (µm)²	88,61±1,13	75,12±2,48**	75,56±2,90
Diâmetro tubular (µm)²	270,50±3,52	230,20±9,76	235,40±6,41

Valores expressos em medianas e intervalos interquantil ¹ ou médias ± SEM ², *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001. One-way ANOVA seguido por Tukey ou teste de Dunnett, respectivamente.

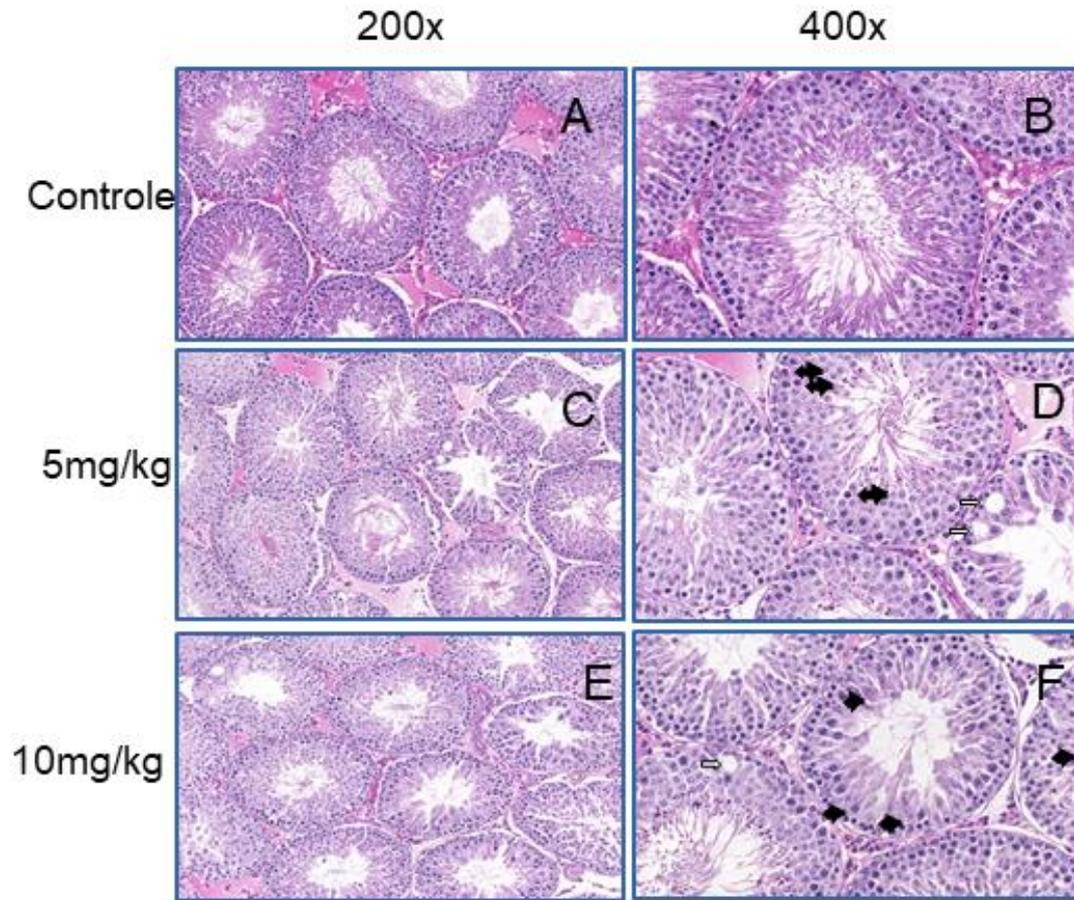


Figure 6. Imagem de secções testiculares dos grupos experimentais tratados com decanoato de nandrolona após repouso de 70 dias (avaliação tardia). Note, nas setas pretas, a presença de células acidófilas e nas setas brancas, a presença de vacuolizações em D e F.

DISCUSSÃO

O DN é uma medicação muito comum entre atletas e amadores devido ao fator anabólico que ela possibilita, sendo um dos EAAs mais utilizados no mundo todo (Cunha, Cunha et al., 2004). Estudos sobre os efeitos toxicológicos deste anabolizante se fazem necessários, principalmente no fator reprodutivo, para conscientizar os usuários dos efeitos colaterais de uma forma mais consistente (Zahmatkesh, Najafi et al., 2014).

Em ratos, estudos toxicológicos sobre a ação de agentes químicos, deve sempre levar em consideração a avaliação de peso corporal final e dos órgãos reprodutores uma vez que são indicadores do status de saúde e toxicidade (Tyl, 2002). Na avaliação imediata, os pesos corporais dos animais nos vários grupos

não apresentaram nenhuma diferença; o mesmo já vem sendo relatado em vários trabalhos (Shokri, Aitken et al., 2010, de Almeida Chuffa, de Souza et al., 2011). No entanto, os órgãos reprodutores como próstata ventral, epidídimo e testículo apresentaram redução de peso no grupo tratado com menor dose, uma redução de mais de 50% na próstata, 27% no testículo e de 35% no epidídimo, resultados semelhantes já foram relatados em outros estudos (Shokri, Aitken et al., 2010, Gronbladh, Johansson et al., 2013, Vargas, Oliveira et al., 2013). No entanto, já se sabe que os hormônios FSH e LH estimulam a secreção de testosterona, ajudando no desenvolvimento e no crescimento dos testículos. A utilização de andrógeno exógeno pode suprimir a produção de testosterona, o que causaria a atrofia testicular em homens e ratos, além disso, os outros órgãos reprodutores, como epidídimo e próstata, também são influenciados pela quantidade de testosterona circulante e o uso de AAS pode causar modificações morfológicas nestes órgãos (Justulin, Ureshino et al., 2006), porém, a redução na concentração do hormônio masculino não foi comprovado na avaliação imediata, o que não ficou muito bem esclarecido, no entanto foi constatado na avaliação tardia, o que justificaria a redução do peso destes órgãos neste experimento (Noorafshan, Karbalay-Doust et al., 2005, Shokri, Aitken et al., 2010). Estes resultados divergiram dos achados de outros estudos em que houve a redução da concentração de testosterona circulantes (Ahmed, 2015, Min and Lee, 2018).

Na avaliação imediata foram encontradas reduções significativas na contagem espermática na cabeça/corpo dos epidídimos em ambos os grupos e na cauda no grupo tratado com menor dose, resultados se repetiram na segunda avaliação com redução em todos os grupos e todas as partes do epidídimo. Já em relação ao testículo, somente foi observado redução na avaliação tardia, diferente do encontrado por Shokri *et al.* (2010), onde foi encontrado a redução da contagem espermática testicular em avaliação imediata, justificado pela disfunção do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal. Porém, além disso, a contagem espermática é outro fator determinante que pode causar alteração no peso de órgãos, e esse corroboraria com os resultados apresentados de redução do peso do epidídimo na primeira avaliação (Ban, Komatsu et al., 1995, Tyl, 2002).

Parâmetros relacionados a qualidade espermática são importantes para avaliar a capacidade fértil dos machos (Yeung, Weinbauer et al., 1999). A motilidade e morfologia são variáveis pertinentes neste tipo de estudo, já que um parâmetro pode influenciar em outro, levando em consideração que aberrações morfológicas podem reduzir a motilidade dos espermatozoides (Wyrobek and Bruce, 1975). Os resultados da avaliação imediata, não revelaram aumentos significativos no número de espermatozoides anormais nos animais tratados com DN, diferente do apresentado na avaliação tardia, onde houve reduções na número de espermatozoides normais e aumento das anormalidades de cabeça, o que corrobora com os achados nas análises histopatológicas, onde foi mostrado aumento no número de células acidófilas e de vacuolizações, o que exprime dificuldade na espermatogênese e que pode acarretar em aberrações morfológicas nestes gametas (Mohd Mutalip, Surindar Singh et al., 2013, Min and Lee, 2018). Porém, ambos os grupos tratados apresentaram diminuição de espermatozoides do tipo A, os mais capacitados para fecundar, tendo como contrapartida o aumento de gametas imóveis (tipo C), desta forma, problemas nesta função, podem levar a infertilidade masculina. Estes resultados, são similares aos achados de Ahmed (2015), que por sua vez, também encontrou redução da motilidade dos gametas masculinas, porém, os resultados revelaram aumento nas anormalidades espermáticas em avaliação imediata. A qualidade espermática na avaliação tardia foi comprometida, com o número de espermatozoides reduzidos em todos compartimentos do epidídimo e diminuição do tempo de trânsito que pode ocasionar aberrações morfológicas e espermatozoides imaturos pela rápida passagem por este órgão (Fernandez, Porto et al., 2008, Robaire and Hamzeh, 2011). O que deixa evidente que na avaliação tardia a morfologia espermática apresentou diminuição do número de espermatozoides normais e aumento e nas anormalidades de cabeça e cauda.

Com a motilidade comprometida, os resultados da inseminação artificial intrauterina demonstraram uma notável redução no potencial fértil nos dois grupos tratados e um aumento na perda pré-implantação, o que pode demonstrar a incapacidade de fertilização dos espermatozoides dos ratos tratados com decanoato de nandrolona. A maior dose ainda apresentou diminuição na taxa de prenhez e aumento na perda pós-implantação, o que sugere que o DNA

espermático pode ter sido comprometido, como já elucidado por vários estudos (Shokri, Hemadi et al., 2014, Ahmed, 2015, Fernandez, Fernandes et al., 2017).

Interpretando os dados obtidos podemos elucidar que o desequilíbrio hormonal acontece após cessada a exposição dos animais aos hormônios exógenos sintéticos, o que acarreta a diminuição da qualidade espermática e provável infertilidade masculina. Para que isso ocorra, uma possível degradação das células de Leydig ou deficiência em suas funções pode ser o motivo causador deste efeito deletério, já que atrofia, mudanças morfológicas e químicas e aparecimento de tumores nestas células, foram citados anteriormente em pesquisas experimentais sobre o assunto (Nagata, Kurosawa et al., 1999, Salerno, Cascio et al., 2018). Para que seja possível compreender melhor a ação deste EAA será necessária uma análise estrutural das células de Leydig e se houve uma possível degradação dessas células nos animais tratados para avaliar se os efeitos podem ser permanentes. Ademais, outros estudos relatam que diminuições morfométricas dos túbulos seminíferos acompanham as disfunções nas células de Leydig (Winters, Moore et al., 2018), o que pode ser observado na avaliação tardia experimento, com reduções na altura do epitélio seminífero, o que já tinha sido observado previamente por Noorafshan, Karbalay-Doust e Ardekani (2005). E ainda, Pomara *et al.* (2016), encontrou que as células de Leydig mostram problemas porque interferem na expressão dos genes StAR e CYP17A1 causando interferência na produção de testosterona após o tratamento com DN .

Os resultados deste estudo, ainda corroboram com a pesquisa de Kahal e Allem (2018), que também chegou à conclusão que as alterações causadas pelo tratamento suprafisiológico com decanoato de nandrolona tem seus efeitos deletérios nos testículos agravados após 6 semanas de encerramento do tratamento, neste trabalho, o tempo foi maior, de 10 semanas e ainda não foi possível observar a recuperação das alterações causadas pelo uso deste esteroide androgênico. Em outro estudo, com a pausa do período de reversão dos efeitos, com duração de 14 semanas, os mesmos resultados foram encontrados com a diminuição da qualidade espermática, porém com 28 semanas, houve melhora dos resultados dos parâmetros espermáticos (Karbalay-Doust, Noorafshan et al., 2007). Isto indica que as alterações ocorridas pelo tratamento com DN tem um prazo longo para serem recuperadas.

Em estudos com humanos e outros tipos de EAAs mostram-se a recuperação dos efeitos deletérios do tratamento com anabolizantes, pode variar de 3 a 10 meses, existindo ainda pesquisas que acreditam que a recuperação total nunca acontece quando o tratamento ocorre de forma contínua com essa medicação e ainda pode acarretar na azoospermia, levando em consideração que o espermatozoide humano é mais sensível que os gametas masculinos de outros mamíferos, como o do rato por exemplo (Holma, 1977, Martikainen, Alen et al., 1986, Lukas, 1993, Boyadjiev, Georgieva et al., 2000, Park, 2018).

CONCLUSÃO

Analisando os resultados, podemos concluir que o DN está ligado a redução da qualidade espermática e infertilidade masculina logo após encerrado o tratamento e o mais preocupante é que seus efeitos pioram depois de um período de repouso de 10 semanas, com aumento dos efeitos deletérios em parâmetros espermáticos, o que mantém a preocupação com a utilização desde medicamento por seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M. A. (2015). "Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway." *Toxicol Appl Pharmacol* **282**(3): 285-296.
- Ames, J. and D. Z. Souza (2012). "Counterfeiting of drugs in Brazil." *Rev Saude Publica* **46**(1): 154-159.
- Ban, Y., T. Komatsu, M. Kemi, S. Inagaki, T. Nakatsuka and H. Matsumoto (1995). "Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats." *Exp Anim* **44**(4): 315-322.
- Boyadjiev, N. P., K. N. Georgieva, R. I. Massaldjieva and S. I. Gueorguiev (2000). "Reversible hypogonadism and azoospermia as a result of anabolic-androgenic steroid use in a bodybuilder with personality disorder. A case report." *J Sports Med Phys Fitness* **40**(3): 271-274.
- Carlini, E. A. G., J.C.; Noto, A.R.; Carlini, C.M.; Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. (2007). "II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005." *Páginas & Letras* **01**: 472.

- Cunha, T. S., N. S. Cunha, M. J. C. S. Moura and F. K. Marcondes (2004). "Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **40**: 165-179.
- de Almeida Chuffa, L. G., R. B. de Souza, F. Frei, S. de Fatima Paccola Mesquita and I. C. Camargo (2011). "Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus." Anat Rec (Hoboken) **294**(2): 335-341.
- Evans, N. A. (2004). "Current concepts in anabolic-androgenic steroids." Am J Sports Med **32**(2): 534-542.
- Fernandez, C. D., G. S. Fernandes, A. P. Favareto, J. E. Perobelli, M. Sanabria and W. D. Kempinas (2017). "Decreased Implantation Number After In Utero Artificial Insemination Can Reflect an Impairment of Fertility in Adult Male Rats After Exogenous Leptin Exposure." Reprod Sci **24**(2): 234-241.
- Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." Int J Androl **31**(4): 427-437.
- Foley, G. L. (2001). "Overview of male reproductive pathology." Toxicol Pathol **29**(1): 49-63.
- Gronbladh, A., J. Johansson, M. M. Kushnir, J. Bergquist and M. Hallberg (2013). "The impact of nandrolone decanoate and growth hormone on biosynthesis of steroids in rats." Steroids **78**(12-13): 1192-1199.
- Haupt, H. A. (1993). "Anabolic steroids and growth hormone." Am J Sports Med **21**(3): 468-474.
- Holma, P. K. (1977). "Effects of an anabolic steroid (metandienone) on spermatogenesis." Contraception **15**(2): 151-162.
- Iriart, J. A., J. C. Chaves and R. G. Orleans (2009). "[Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders]." Cad Saude Publica **25**(4): 773-782.
- Justulin, L. A., Jr., R. P. Ureshino, M. Zanoni and S. L. Felisbino (2006). "Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement." Cell Biol Int **30**(4): 354-364.
- Kahal, A. and R. Allem (2018). "Reversible effects of anabolic steroid abuse on cyto-architectures of the heart, kidneys and testis in adult male mice." Biomed Pharmacother **106**: 917-922.
- Karbalay-Doust, S., A. Noorafshan, F. M. Ardekani and H. Mirkhani (2007). "The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats." Asian J Androl **9**(2): 235-239.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. F. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman, M. G. Narotsky, S. D. Perreault, D. P. Evenson, D. D. Ricker and G. R. Klinefelter (1998). "Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 897-904.
- Kim, J. Y. and R. I. Wood (2014). "Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats." Horm Behav **66**(4): 585-590.
- Klinefelter, G. R., J. W. Laskey, S. D. Perreault, J. Ferrell, S. Jeffay, J. Suarez and N. Roberts (1994). "The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis." J Androl **15**(4): 318-327.
- Klinefelter, G. R., J. E. Welch, S. D. Perreault, H. D. Moore, R. M. Zucker, J. D. Suarez, N. L. Roberts, K. Bobseine and S. Jeffay (2002). "Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro." J Androl **23**(1): 48-63.
- Lukas, S. E. (1993). "Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse." Trends Pharmacol Sci **14**(2): 61-68.
- Martikainen, H., M. Alen, P. Rahkila and R. Vihko (1986). "Testicular responsiveness to human chorionic gonadotrophin during transient hypogonadotropic hypogonadism

- induced by androgenic/anabolic steroids in power athletes." J Steroid Biochem **25**(1): 109-112.
- Min, T. and K. H. Lee (2018). "Effects of nandrolone decanoate on expression of steroidogenic enzymes in the rat testis." Asian-Australas J Anim Sci **31**(5): 658-671.
- Mohd Mutalip, S. S., G. K. Surindar Singh, A. Mohd Shah, M. Mohamad, V. Mani and S. N. Hussin (2013). "Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol." Iran J Reprod Med **11**(8): 653-658.
- Moraes, T. P. B. (2015). "Anabolizantes nas buscas da WEB. Um estudo sobre o interesse sazonal por esteroides no Brasil." RJLB: 1979-2007.
- Nagata, S., M. Kurosawa, K. Mima, Y. Nambo, Y. Fujii, G. Watanabe and K. Taya (1999). "Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormones in the stallion." J Reprod Fertil **115**(2): 373-379.
- Noorafshan, A., S. Karbalay-Doust and F. M. Ardekani (2005). "High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats." Apmis **113**(2): 122-125.
- Park, H. J. (2018). "Anabolic steroid-induced hypogonadism: a challenge for clinicians." J Exerc Rehabil **14**(1): 2-3.
- Pomara, C., R. Barone, A. Marino Gammazza, C. Sangiorgi, F. Barone, A. Pitruzzella, N. Locorotondo, F. Di Gaudio, M. Salerno, F. Maglietta, A. L. Sarni, V. Di Felice, F. Cappello and E. Turillazzi (2016). "Effects of Nandrolone Stimulation on Testosterone Biosynthesis in Leydig Cells." J Cell Physiol **231**(6): 1385-1391.
- Robaire, B. and M. Hamzeh (2011). "Androgen action in the epididymis." J Androl **32**(6): 592-599.
- Robb, G. W., R. P. Amann and G. J. Killian (1978). "Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats." J Reprod Fertil **54**(1): 103-107.
- Salerno, M., O. Cascio, G. Bertozzi, F. Sessa, A. Messina, V. Monda, L. Cipolloni, A. Biondi, A. Daniele and C. Pomara (2018). "Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review." Oncotarget **9**(27): 19415-19426.
- Shokri, S., R. J. Aitken, M. Abdolvahabi, F. Abolhasani, F. M. Ghasemi, I. Kashani, S. Ejtemaeimehr, S. Ahmadian, B. Minaei, M. A. Naraghi and M. Barbarestani (2010). "Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells." Basic Clin Pharmacol Toxicol **106**(4): 324-330.
- Shokri, S., M. Hemadi, G. Bayat, M. Bahmanzadeh, I. Jafari-Anarkooli and B. Mashkani (2014). "Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa." Andrologia **46**(2): 184-190.
- Snyder, P. J. (1984). "Clinical use of androgens." Annu Rev Med **35**: 207-217.
- Tyl, R. W. (2002). "In vivo models for male reproductive toxicology." Curr Protoc Toxicol **Chapter 16**: Unit16.11.
- Vargas, R. A., L. P. Oliveira, S. Frankenfeld, D. B. Souza, W. S. Costa, L. A. Favorito and F. J. Sampaio (2013). "The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats." Int Braz J Urol **39**(5): 675-682.
- Venâncio, D. P., A. C. L. d. Nóbrega, S. Tufik and M. T. d. Mello (2010). "Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **16**: 191-195.
- Winters, S. J., J. P. Moore, Jr. and B. J. Clark (2018). "Leydig cell insufficiency in hypospermatogenesis: a paracrine effect of activin-inhibin signaling?" Andrology **6**(2): 262-271.

Wyrobek, A. J. and W. R. Bruce (1975). "Chemical induction of sperm abnormalities in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(11): 4425-4429.

Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (1995). "Anabolic-androgenic steroids. Current issues." Sports Med **19**(5): 326-340.

Yeung, C. H., G. F. Weinbauer and T. G. Cooper (1999). "Effect of acute androgen withdrawal by GnRH antagonist on epididymal sperm motility and morphology in the cynomolgus monkey." J Androl **20**(1): 72-79.

Zahmatkesh, E., G. Najafi, V. Nejati and R. Heidari (2014). "Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone." Avicenna J Phytomed **4**(1): 43-52.

VII - CONCLUSÃO GERAL

Baseado nos fatos esclarecidos neste trabalho, podemos observar que todos os EAAs estudados tem relação com a diminuição da qualidade espermática e problemas com a fertilidade em ratos machos. Porém, diferenças foram apontadas tanto para a agressividade dos efeitos deletérios causados pelos anabolizantes quanto para o período em que os efeitos pioram.

A oximetolona teve a maior problemática nas dosagens hormonais, reduzindo bruscamente os níveis de LH, FSH e testosterona intratesticular nos animais tratados com esta medicação, o que ocasionou problemas na qualidade espermática. Porém, após a avaliação tardia, pode-se observar que as reduções hormonais são recuperadas após o repouso do tratamento e as outras alterações na qualidade espermática caminham para a recuperação.

Enquanto que o estanozolol, diminuiu drasticamente as dosagens hormonais, qualidade espermática e a fertilidade nos ratos que foram tratados com este EAAs na avaliação imediata, contudo, na avaliação tardia, as alterações se recuperaram parcialmente, havendo a necessidade, talvez, de maior tempo de repouso para obtenção da total recuperação.

Já o decanoato de nandrolona, apresentou alguns efeitos deletérios na qualidade espermática e de fertilidade na avaliação imediata e drásticos efeitos, como reduções das concentrações hormonais e na qualidade espermática na avaliação tardia, o que demonstra ser o mais agressivo dos EAAs analisados, pelos efeitos piorarem repouso do uso deste medicamento.

Contudo, fica evidente, que a preocupação com o uso de EAAs é um fato comprovado, sobretudo em relação a saúde reprodutora dos machos e que a utilização desnecessária desta categoria de medicamentos deve ser evitada pelos seres humanos.

VIII – BIBLIOGRAFIA

(1999). "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Oxymetholone (CAS NO. 434-07-1) in F344/N Rats and Toxicology Studies of Oxymetholone in B6C3F1 Mice (Gavage Studies)." Natl Toxicol Program Tech Rep Ser **485**: 1-233.

Adhikary, P. M. and R. A. Harkness (1971). "The use of carbon skeleton chromatography for the detection of steroid drug metabolites: the metabolism of anabolic steroids in man." Acta Endocrinol (Copenh) **67**(4): 721-732.

Ahmed, M. A. (2015). "Amelioration of nandrolone decanoate-induced testicular and sperm toxicity in rats by taurine: effects on steroidogenesis, redox and inflammatory cascades, and intrinsic apoptotic pathway." Toxicol Appl Pharmacol **282**(3): 285-296.

Albertson, T. E., J. A. Chenoweth, D. K. Colby and M. E. Sutter (2016). "The Changing Drug Culture: Use and Misuse of Appearance- and Performance-Enhancing Drugs." FP Essent **441**: 30-43.

Ames, J. and D. Z. Souza (2012). "Counterfeiting of drugs in Brazil." Rev Saude Publica **46**(1): 154-159.

Andrade, G. H. B., V. A. Simao, B. R. Souza, L. G. A. Chuffa and I. C. C. Camargo (2018). "Sex steroid receptors profiling is influenced by nandrolone decanoate in the ampulla of the fallopian tube: Post-treatment and post-recovery analyses." Tissue Cell **50**: 79-88.

Angell, P., N. Chester, D. Green, J. Somauroo, G. Whyte and K. George (2012). "Anabolic steroids and cardiovascular risk." Sports Med **42**(2): 119-134.

Bahrke, M. S., C. E. Yesalis, A. N. Kopstein and J. A. Stephens (2000). "Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents." Sports Med **29**(6): 397-405.

Ban, Y., T. Komatsu, M. Kemi, S. Inagaki, T. Nakatsuka and H. Matsumoto (1995). "Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats." Exp Anim **44**(4): 315-322.

Barone, R., A. Pitruzzella, A. Marino Gammazza, F. Rappa, M. Salerno, F. Barone, C. Sangiorgi, D. D'Amico, N. Locorotondo, F. Di Gaudio, L. Cipolloni, V. Di Felice, S. Schiavone, V. Rapisarda, G. Sani, A. Tambo, F. Cappello, E. Turillazzi and C. Pomara (2017). "Nandrolone decanoate interferes with testosterone biosynthesis altering blood-testis barrier components." J Cell Mol Med **21**(8): 1636-1647.

Blanchard, T. L., R. G. Elmore, R. S. Youngquist, W. E. Loch, D. K. Hardin, C. J. Bierschwal, V. K. Ganjam, J. M. Balke, M. R. Ellersieck, L. J. Dawson and W. S. Miner (1983). "The effects of stanozolol and boldenone undecylenate on scrotal width, testis weight, and sperm production in pony stallions." Theriogenology **20**(1): 121-131.

Burns, T. (2007). CHAPTER 27 - The Epididymis. Current Therapy in Equine Reproduction. J. C. Samper, J. F. Pycocock and A. O. McKinnon. Saint Louis, W.B. Saunders: 171-173.

Busardo, F. P., P. Frati, M. D. Sanzo, S. Napoletano, E. Pinchi, S. Zaami and V. Fineschi (2015). "The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system." Curr Neuropharmacol **13**(1): 122-131.

Campion, S., N. Catlin, N. Heger, E. V. McDonnell, S. E. Pacheco, C. Saffarini, M. A. Sandrof and K. Boekelheide (2012). "Male reprotoxicity and endocrine disruption." Exp Suppl **101**: 315-360.

Carlini, E. A. G., J.C.; Noto, A.R.; Carlini, C.M.; Oliveira, L.G.; Nappo, S.A.; Moura, Y.G.; Sanchez, Z.V.D.M. (2007). "II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas

- psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005." Páginas & Letras **01**: 472.
- Castro Martins, M., M. J. Peffers, K. Lee and L. M. Rubio-Martinez (2018). "Effects of stanozolol on normal and IL-1beta-stimulated equine chondrocytes in vitro." BMC Vet Res **14**(1): 103.
- Celotti, F. and P. Negri Cesi (1992). "Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics." J Steroid Biochem Mol Biol **43**(5): 469-477.
- Clark, A. S., E. V. Harrold and A. S. Fast (1997). "Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats." Horm Behav **31**(1): 35-46.
- Clegg, E. D., Perreault, S. D., & Klinefelter, G. R. (2001). "Assessment of male reproductive toxicology." Principles and Methods of Toxicology: 1263-1299.
- Costa, K. L., S. L. da Matta, M. de Lucca Moreira Gomes, T. A. de Paula, K. M. de Freitas, F. de Araujo Resende Carvalho, J. de Assis Silveira, H. Dolder and S. M. Chamindrani Mendis-Handagama (2011). "Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield." Anim Reprod Sci **127**(3-4): 202-212.
- Creasy, D., A. Bube, E. de Rijk, H. Kandori, M. Kuwahara, R. Masson, T. Nolte, R. Reams, K. Regan, S. Rehm, P. Rogerson and K. Whitney (2012). "Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system." Toxicol Pathol **40**(6 Suppl): 40s-121s.
- Cunha, T. S., N. S. Cunha, M. J. C. S. Moura and F. K. Marcondes (2004). "Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **40**: 165-179.
- Cunningham, G. R. and C. Huckins (1979). "Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone." Endocrinology **105**(1): 177-186.
- de Kretser, D. M. (1979). "Endocrinology of male infertility." Br Med Bull **35**(2): 187-192.
- de Kretser, D. M., K. L. Loveland, A. Meinhardt, D. Simorangkir and N. Wreford (1998). "Spermatogenesis." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 1-8.
- Do Carmo, E. C., T. Fernandes, D. Koike, N. D. Da Silva, Jr., K. C. Mattos, K. T. Rosa, D. Barretti, S. F. Melo, R. B. Wich, M. C. Irigoyen and E. M. de Oliveira (2011). "Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects." Med Sci Sports Exerc **43**(10): 1836-1848.
- Dong, Q. H., M.P. (2017). Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles. Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles.
- Dornas, W. C. O., T.T.; Nagem, T.J.. (2008). "Anabolic steroids use and its adverse effects on the cardiovascular system." Revista Brasileira de Farmacologia **89**(3).
- Dornelles, G. L., A. Bueno, J. S. de Oliveira, A. S. da Silva, R. T. Franca, C. B. da Silva, M. S. Machado, L. D. Petry, F. H. Abdalla, C. L. Lhamas and C. M. de Andrade (2017). "Biochemical and oxidative stress markers in the liver and kidneys of rats submitted to different protocols of anabolic steroids." Mol Cell Biochem **425**(1-2): 181-189.
- Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Exogenous Androgens and Male Reproduction." Adv Exp Med Biol **1034**: 25-28.
- Drobnis, E. Z. and A. K. Nangia (2017). "Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents." Adv Exp Med Biol **1034**: 13-24.
- Elfgen, V., A. Mietens, M. Mewe, T. Hau and R. Middendorff (2018). "Contractility of the epididymal duct - function, regulation and potential drug effects." Reproduction.

- Ellis, H. and V. Mahadevan (2014). "Scrotum, testis and epididymis." Surgery (Oxford) **32**: e9-e16.
- Evans, N. A. (2004). "Current concepts in anabolic-androgenic steroids." Am J Sports Med **32**(2): 534-542.
- Fawcett, D. W., W. B. Neaves and M. N. Flores (1973). "Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis." Biol Reprod **9**(5): 500-532.
- Feinberg, M. J., A. R. Lumia and M. Y. McGinnis (1997). "The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats." Physiol Behav **62**(1): 23-30.
- Fernandez, C. D., G. S. Fernandes, A. P. Favareto, J. E. Perobelli, M. Sanabria and W. D. Kempinas (2017). "Decreased Implantation Number After In Utero Artificial Insemination Can Reflect an Impairment of Fertility in Adult Male Rats After Exogenous Leptin Exposure." Reprod Sci **24**(2): 234-241.
- Fernandez, C. D., E. M. Porto, A. C. Arena and G. Kempinas Wde (2008). "Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality." Int J Androl **31**(4): 427-437.
- Filler, R. (1993). Male reproductive toxicology.
- Fink, J., B. J. Schoenfeld and K. Nakazato (2018). "The role of hormones in muscle hypertrophy." Phys Sportsmed **46**(1): 129-134.
- Foley, G. L. (2001). "Overview of male reproductive pathology." Toxicol Pathol **29**(1): 49-63.
- Gage, M. J. (1998). "Mammalian sperm morphometry." Proc Biol Sci **265**(1391): 97-103.
- Ganesan, K. and M. V. Pellegrini (2018). Anabolic Steroids. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Ge, R., G. Chen and M. P. Hardy (2008). "The role of the Leydig cell in spermatogenic function." Adv Exp Med Biol **636**: 255-269.
- Ghaphery, N. A. (1995). "Performance-enhancing drugs." Orthop Clin North Am **26**(3): 433-442.
- Goldberg, L., D. P. MacKinnon, D. L. Elliot, E. L. Moe, G. Clarke and J. Cheong (2000). "The adolescents training and learning to avoid steroids program: preventing drug use and promoting health behaviors." Arch Pediatr Adolesc Med **154**(4): 332-338.
- Goodale, T., A. Sadhu, S. Petak and R. Robbins (2017). "Testosterone and the Heart." Methodist DeBakey Cardiovasc J **13**(2): 68-72.
- Gronbladh, A., J. Johansson, M. M. Kushnir, J. Bergquist and M. Hallberg (2013). "The impact of nandrolone decanoate and growth hormone on biosynthesis of steroids in rats." Steroids **78**(12-13): 1192-1199.
- Gwatkin, R. B. L. (1993). "The Sertoli cell, edited by Lonnie D. Russell and Michael D. Griswold, Cache River Press, Clearwater, FL, 1993, 826 pp, \$137.50." Molecular Reproduction and Development **36**(4): 517-517.
- Harkness, R. A., B. H. Kilshaw and B. M. Hobson (1975). "Effects of large doses of anabolic steroids." British journal of sports medicine **9**(2): 70-73.
- Haupt, H. A. (1993). "Anabolic steroids and growth hormone." Am J Sports Med **21**(3): 468-474.
- Hess, R. A. and L. Renato de Franca (2008). "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium." Adv Exp Med Biol **636**: 1-15.
- Higgins, S. J. and U. Gehring (1978). "Molecular mechanisms of steroid hormone action." Adv Cancer Res **28**: 313-397.
- Hoberman, J. M. and C. E. Yesalis (1995). "The history of synthetic testosterone." Sci Am **272**(2): 76-81.

- Iriart, J. A., J. C. Chaves and R. G. Orleans (2009). "[Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders]." Cad Saude Publica **25**(4): 773-782.
- Jones, R. E. and K. H. Lopez (2014). Chapter 4 - The Male Reproductive System. Human Reproductive Biology (Fourth Edition). R. E. Jones and K. H. Lopez. San Diego, Academic Press: 67-83.
- Justulin, L. A., Jr., R. P. Ureshino, M. Zanoni and S. L. Felisbino (2006). "Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement." Cell Biol Int **30**(4): 354-364.
- Kahal, A. and R. Allem (2018). "Reversible effects of anabolic steroid abuse on cyto-architectures of the heart, kidneys and testis in adult male mice." Biomed Pharmacother **106**: 917-922.
- Kam, P. C. and M. Yarrow (2005). "Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations." Anaesthesia **60**(7): 685-692.
- Kantarci, U. H., Z. Punduk, O. Senarslan and A. Dirik (2017). "Evaluation of anabolic steroid induced renal damage with sonography in bodybuilders." J Sports Med Phys Fitness.
- Keihani, S., C. Martin, J. R. Craig, C. Zhang, A. P. Presson, J. B. Myers, K. I. Aston, B. R. Emery, D. T. Carrell and J. M. Hotaling (2018). "Semen parameters are unaffected by statin use in men evaluated for infertility." Andrologia **50**(5): e12995.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman and G. R. Klinefelter (1998). "Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 890-896.
- Kempinas, W. D., J. D. Suarez, N. L. Roberts, L. F. Strader, J. Ferrell, J. M. Goldman, M. G. Narotsky, S. D. Perreault, D. P. Evenson, D. D. Ricker and G. R. Klinefelter (1998). "Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy." Biol Reprod **59**(4): 897-904.
- Kennedy, M. C. and A. J. O'Sullivan (1997). "Do anabolic-androgenic steroids enhance sporting performance?" Med J Aust **166**(2): 60-61.
- Khan, N. T., M. Bibi, S. Yousuf, I. H. Qureshi, N. Atta-Ur-Rahman, A. M. Al-Majid, M. A. Mesaik, A. S. Khalid, S. A. Sattar, N. Atia-Tul-Wahab and M. I. Choudhary (2012). "Synthesis of some potent immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of anabolic steroid oxymetholone." Chem Cent J **6**(1): 153.
- Kim, J. Y. and R. I. Wood (2014). "Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats." Horm Behav **66**(4): 585-590.
- Kioukia-Fougia, N., N. Georgiadis, K. Tsarouhas, F. Vasilaki, P. Fragiadaki, E. Meimeti and C. Tsitsimpikou (2017). "Synthetic and Natural Nutritional Supplements: Health "Allies" or Risks to Public Health?" Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **10**(2): 72-85.
- Klinefelter, G. R., J. W. Laskey, S. D. Perreault, J. Ferrell, S. Jeffay, J. Suarez and N. Roberts (1994). "The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis." J Androl **15**(4): 318-327.
- Koepfen, B. S. B. (2008). Berne & Levy Physiology.
- Kuhn, C. M. (2002). "Anabolic steroids." Recent Prog Horm Res **57**: 411-434.
- Leuchtenberger, C. and F. Schrader (1950). "The chemical nature of the acrosome in the male germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **36**(11): 677-683.
- MacDonald, B. S., P. J. Sykes, B. H. Kilshaw and R. A. Harkness (1973). "Proceedings: Metabolism of the hydroxymethylene group in the anabolic steroid, oxymetholone: isolation and identification of two major metabolites." J Endocrinol **59**(2): 18-19.
- Magnusson, K., A. Hanell, I. Bazov, F. Clausen, Q. Zhou and F. Nyberg (2009). "Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA

- expression and impairs Morris water maze performance in male rats." Neurosci Lett **467**(3): 189-193.
- Maravelias, C., A. Dona, M. Stefanidou and C. Spiliopoulou (2005). "Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat." Toxicol Lett **158**(3): 167-175.
- Matzkin, M. E., S. Yamashita and M. Ascoli (2013). "The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells." Mol Cell Endocrinol **370**(1-2): 130-137.
- Meistrich, M. L. and R. A. Hess (2013). "Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules." Methods Mol Biol **927**: 299-307.
- Melnik, B., T. Jansen and S. Grabbe (2007). "Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem." J Dtsch Dermatol Ges **5**(2): 110-117.
- Min, T. and K. H. Lee (2018). "Effects of nandrolone decanoate on expression of steroidogenic enzymes in the rat testis." Asian-Australas J Anim Sci **31**(5): 658-671.
- Mohd Mutalip, S. S., G. K. Surindar Singh, A. Mohd Shah, M. Mohamad, V. Mani and S. N. Hussin (2013). "Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol." Iran J Reprod Med **11**(8): 653-658.
- Monsees, T. K., M. Franz, S. Gebhardt, U. Winterstein, W. B. Schill and J. Hayatpour (2000). "Sertoli cells as a target for reproductive hazards." Andrologia **32**(4-5): 239-246.
- Moraes, T. P. B. (2015). "Anabolizantes nas buscas da WEB. Um estudo sobre o interesse sazonal por esteroides no Brasil." RJLB: 1979-2007.
- Mrsny, R. J. and S. Meizel (1981). "Potassium ion influx and Na⁺,K⁺-ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction." J Cell Biol **91**(1): 77-82.
- Noda, T. and M. Ikawa (2019). "Physiological function of seminal vesicle secretions on male fecundity." **18**(3): 241-246.
- Noorafshan, A., S. Karbalay-Doust and F. M. Ardekani (2005). "High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats." Apmis **113**(2): 122-125.
- O'Donnell, L., P. Stanton and D. M. de Kretser (2000). *Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis*. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc.
- O'Shaughnessy, P. J., I. D. Morris, I. Huhtaniemi, P. J. Baker and M. H. Abel (2009). "Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice." Mol Cell Endocrinol **306**(1-2): 2-8.
- Oda, S. S. and I. M. El-Ashmawy (2012). "Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits." Int J Exp Pathol **93**(3): 172-178.
- Ozcagli, E., M. Kara, T. Kotil, P. Fragkiadaki, M. N. Tzatzarakis, C. Tsitsimpikou, P. D. Stivaktakis, D. Tsoukalas, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis and B. Alpertunga (2018). "Stanozolol administration combined with exercise leads to decreased telomerase activity possibly associated with liver aging." International Journal of Molecular Medicine **42**(1): 405-413.
- Parkinson, A. B. and N. A. Evans (2006). "Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users." Med Sci Sports Exerc **38**(4): 644-651.
- Pelletier, J. (1970). "Mode of action of testosterone propionate on the secretion and release of luteinizing hormone (Lh in the castrated ram)." Acta Endocrinol (Copenh) **63**(2): 290-298.
- Phillips, D. M. (1972). "Comparative analysis of mammalian sperm motility." J Cell Biol **53**(2): 561-573.

- Pomara, C., R. Barone, A. Marino Gammazza, C. Sangiorgi, F. Barone, A. Pitruzzella, N. Locorotondo, F. Di Gaudio, M. Salerno, F. Maglietta, A. L. Sarni, V. Di Felice, F. Cappello and E. Turillazzi (2016). "Effects of Nandrolone Stimulation on Testosterone Biosynthesis in Leydig Cells." J Cell Physiol **231**(6): 1385-1391.
- Pope, H. G., Jr. and D. L. Katz (1994). "Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes." Arch Gen Psychiatry **51**(5): 375-382.
- Prasad, M. R. N. and M. Rajalakshmi (1976). "Comparative physiology of the mammalian epididymis." General and Comparative Endocrinology **28**(4): 530-537.
- Robaire, B., B. T. Hinton and M.-C. Orgebin-Crist (2006). CHAPTER 22 - The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). J. D. Neill. St Louis, Academic Press: 1071-1148.
- Robb, G. W., R. P. Amann and G. J. Killian (1978). "Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats." J Reprod Fertil **54**(1): 103-107.
- Rocha, F. L. R., F.R.; Oliveira, E.M.. (2007). "Anaboli steroids: action mechanism and effects on the cardiovascular system." O mundo da saúde São Paulo **31**(4): 470-477.
- Rubinow, K. B. (2017). "Estrogens and Body Weight Regulation in Men." Adv Exp Med Biol **1043**: 285-313.
- Russell, L. D., R. A. Ettl, A. P. S. Hikim and E. D. Clegg (1993). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." International Journal of Andrology **16**(1): 83-83.
- Russell, L. D. and R. N. Peterson (1985). "Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates." Int Rev Cytol **94**: 177-211.
- Russell, L. D., H. P. Ren, I. Sinha Hikim, W. Schulze and A. P. Sinha Hikim (1990). "A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell." Am J Anat **188**(1): 21-30.
- Salerno, M., O. Cascio, G. Bertozzi, F. Sessa, A. Messina, V. Monda, L. Cipolloni, A. Biondi, A. Daniele and C. Pomara (2018). "Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review." Oncotarget **9**(27): 19415-19426.
- Santos, A. F., P. M. H. Mendonça, L. d. A. Santos, N. F. Silva and J. K. L. Tavares (2006). "Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE)." Psicologia em Estudo **11**: 371-380.
- Schanzer, W. (1996). "Metabolism of anabolic androgenic steroids." Clin Chem **42**(7): 1001-1020.
- Schiffer, L., W. Arlt and K. H. Storbeck (2018). "Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited." Mol Cell Endocrinol **465**: 4-26.
- Seed, J., R. E. Chapin, E. D. Clegg, L. A. Dostal, R. H. Foote, M. E. Hurtt, G. R. Klinefelter, S. L. Makris, S. D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K. A. Treinen, D. N. Veeramachaneni and L. D. Wise (1996). "Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation." Reprod Toxicol **10**(3): 237-244.
- Shahidi, N. T. (2001). "A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids." Clin Ther **23**(9): 1355-1390.
- Shokri, S., R. J. Aitken, M. Abdolvahabi, F. Abolhasani, F. M. Ghasemi, I. Kashani, S. Ejtemaimehr, S. Ahmadian, B. Minaei, M. A. Naraghi and M. Barbarestani (2010). "Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells." Basic Clin Pharmacol Toxicol **106**(4): 324-330.

- Shokri, S., M. Hemadi, G. Bayat, M. Bahmanzadeh, I. Jafari-Anarkooli and B. Mashkani (2014). "Combination of running exercise and high dose of anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases protamine deficiency and DNA damage in rat spermatozoa." Andrologia **46**(2): 184-190.
- Silva, L. S. M. F. and R. L. d. M. Moreau (2003). "Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **39**: 327-333.
- Silva, P. R. P. d., R. Danielski and M. A. Czepielewski (2002). "Esteróides anabolizantes no esporte." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **8**: 235-243.
- Silva, P. R. P. d., L. C. Machado Júnior, V. C. Figueiredo, A. P. Cioffi, M. C. Prestes and M. A. Czepielewski (2007). "Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **51**: 104-110.
- Silva, P. R. P. d., G. A. Maranhao Neto, V. C. Figueiredo, A. M. P. V. d. Santos, M. H. V. M. Jacob, E. H. d. Rose and L. P. d. Costa (2017). "DOPING SURVEY IN THE YOUTH SCHOOL GAMES IN BRAZIL." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **23**: 436-440.
- Sjoqvist, F., M. Garle and A. Rane (2008). "Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society." Lancet **371**(9627): 1872-1882.
- Snyder, P. J. (1984). "Clinical use of androgens." Annu Rev Med **35**: 207-217.
- Sweeney, E. C. and D. J. Evans (1976). "Hepatic lesions in patients treated with synthetic anabolic steroids." Journal of clinical pathology **29**(7): 626-633.
- Takahashi, M., Y. Tatsugi and T. Kohno (2004). "Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats." Endocr J **51**(4): 425-434.
- Tofighi, A., S. Ahmadi, S. M. Seyyedi, A. Shirpoor, F. Kheradmand and F. H. Gharalari (2018). "Nandrolone administration with or without strenuous exercise promotes overexpression of nephrin and podocin genes and induces structural and functional alterations in the kidneys of rats." Toxicol Lett **282**: 147-153.
- Tsitsimpikou, C., N. Chrisostomou, P. Papalexis, K. Tsarouhas, A. Tsatsakis and A. Jamurtas (2011). "The use of nutritional supplements among recreational athletes in Athens, Greece." Int J Sport Nutr Exerc Metab **21**(5): 377-384.
- Tyl, R. W. (2002). "In vivo models for male reproductive toxicology." Curr Protoc Toxicol **Chapter 16**: Unit16.11.
- Vargas, R. A., L. P. Oliveira, S. Frankenfeld, D. B. Souza, W. S. Costa, L. A. Favorito and F. J. Sampaio (2013). "The prostate after administration of anabolic androgenic steroids: a morphometrical study in rats." Int Braz J Urol **39**(5): 675-682.
- Venâncio, D. P., A. C. L. d. Nóbrega, S. Tufik and M. T. d. Mello (2010). "Avaliação descritiva sobre o uso de esteróides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido." Revista Brasileira de Medicina do Esporte **16**: 191-195.
- Wilson, J. D. (1988). "Androgen abuse by athletes." Endocr Rev **9**(2): 181-199.
- Yesalis, C. E. and M. S. Bahrke (1995). "Anabolic-androgenic steroids. Current issues." Sports Med **19**(5): 326-340.
- Zahmatkesh, E., G. Najafi and V. Nejati (2015). "Protective Effect of Royal Jelly on In Vitro Fertilization (IVF) in Male Mice Treated with Oxymetholone." Cell J **17**(3): 569-575.
- Zahmatkesh, E., G. Najafi, V. Nejati and R. Heidari (2014). "Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone." Avicenna J Phytomed **4**(1): 43-52.

Zhang, Q.-S., E. Benedetti, M. Deater, K. Schubert, A. Major, C. Pelz, S. Impey, L. Marquez-Loza, R K. Rathbun, S. Kato, Grover C. Bagby and M. Grompe (2015). "Oxymetholone Therapy of Fanconi Anemia Suppresses Osteopontin Transcription and Induces Hematopoietic Stem Cell Cycling." Stem Cell Reports **4**(1): 90-102.

Zirkin, B. R. and V. Papadopoulos (2018). "Leydig cells: formation, function, and regulation†." Biology of Reproduction **99**(1): 101-111.

IX - ANEXOS

Tabela descritiva dos resultados

	Morfologia	Motilidade	Qualidade espermática				PDE	T.T.	Peso de órgãos	Fertilidade (IA)	Dosagem hormonal	Histopatologia	Morfometria	Ciclo espermático
			Contagem testículo	Contagem epidídimo										
Oximetolona														
Avaliação imediata	-	↓ tipo A O10 ↑ tipo C O10	-	↓ zoides O10 C/c	-	-	-	↓ vesícula seminal cheia O5 e O10 ↓ vesícula seminal cheia peso relativo O5 e O10 ↓ vesícula seminal vazia peso relativo O5	-	↓ LH, FSH e testosterona intratesticular O5 e O10	↑ túbulos seminíferos normais O5	-	-	
Avaliação tardia	-	-	↓ espermátide O10 *não repete no peso relativo	↓ zoides O10 C/c	↓	*não repete no peso relativo	-	-	Não refeito	↓ progesterona O5 e O10	-	-	-	
Estanozolol														
Avaliação imediata	↓ zoides normais E10 ↑ anor. de cauda E10 ↑ anor. de cabeça E10 e E5	↓ tipo A E5 e E10 ↑ tipo C E10	↓ espermátide E5 e E10 *não repete no peso relativo	↓ zoides E5 e E10 C/c ↓ zoides E10 Cauda	↓	*não repete no peso relativo	↓ C/c Cauda	↓ quase todos órgãos E5 e E10 (-) vesícula seminal vazia E10 (-) vesícula seminal vazia peso relativo E5 e E10	↑ perda pré-implantação E5 e E10 ↓ potencial fértil E5 e E10	↓ FSH, LF, testosterona intratesticular E5 e E10 ↓ progesterona E10	↑ células acidófilas E5 e E10 ↑ vacuolizações E5 e E10	↓ altura epitélio germinativo E5 e E10 ↓ diâmetro do túbulo seminífero E5 e E10	↓ estágio VII-VIII em E5	
Avaliação tardia	-	↓ tipo A E5 e E10 ↑ tipo B E5 ↑ tipo C E10	↓ espermátide E5	↓ zoides E5 C/c ↓ zoides E5 e E10 Cauda	↓	-	-	↓ próstata E5	Não refeito	-	-	-	-	
Decanoato de nandrolona														
Avaliação imediata	↓ zoides normais N5	↓ tipo A N5 e N10 ↑ tipo C N5 e N10	-	↓ zoides N5 e N10 C/c ↓ zoides N5 Cauda	-	-	-	↓ próstata, próstata peso relativo, epidídimo, testículo e testículo peso relativo E5 ↑ vesícula seminal cheia e vesícula seminal vazia E10 ↓ epidídimo peso relativo E10	↓ potencial fértil N5 e N10 ↑ perda pré-implantação N5 e N10 ↓ taxa de prenhez N10 ↑ perda pós-implantação N10	-	↓ túbulos seminíferos normais N5 e N10 ↑ Células acidófilas N5 e N10 ↑ vacuolizações N10	-	-	
Avaliação tardia	↓ zoides normais N5 ↑ anor. de cabeça N5	↓ tipo A N5 ↓ tipo B N5	↓ espermátide N5 e N10	↓ zoides N5 e N10 C/c e cauda	↓	-	↓ C/c Cauda	↓ todos os órgãos E5 e E10	Não refeito	↓ LH, testosterona e testosterona intratesticular N5 e N10	↓ túbulos seminíferos normais N5 ↑ células acidófilas N5	↓ altura do epitélio germinativo N5	-	

Legenda:

↓: redução
 ↑: aumento
 anor.: anormalidades
 Zoides: espermatozoides
 PDE: Produção diária espermática
 T.T.: Tempo de trânsito no epidídimo

C/c: Cabeça/corpo do epidídimo
 (-): com exceção
 (IA): inseminação artificial intrauterina

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

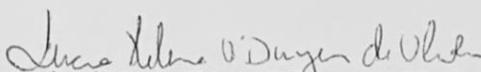


Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da toxicidade reprodutiva de anabolizantes em ratos Wistar machos adultos", Protocolo nº 938-CEUA, sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 10/1/2017	Término: 28/2/2020
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	208	
Peso:	300g	Idade: 75 dias
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Biotério Central da Unesp – Câmpus de Botucatu/SP	

Botucatu, 9 de dezembro de 2016.


Profª Adjª Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira
Vice-Presidente da CEUA

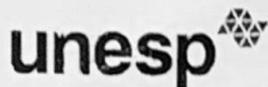


Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: seccta@ibb.unesp.br



Scanned with
CamScanner

**Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP
em inglês**



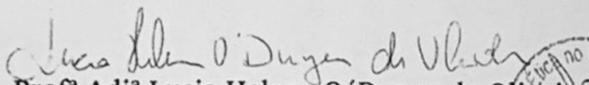
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificate

We certify that the protocol nº **938** about "Reproductive toxicity assessment of anabolic steroids in male adult Wistar rats" agree with Brazilian legislation regulated by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH formulated by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals, and was approved by the BIOSCIENCE INSTITUTE/UNESP ETHICS COMMITTEE ON USE OF ANIMALS (CEUA), in December, 9th 2016.

Botucatu, December, 9th 2016.


Prof^a Adj^a Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Vice-Presidente da CEUA/IBB



Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº - Cep: 14.051-0-689
Tel 14 3880 0851 - e-mail: secda@ibb.unesp.br



Scanned with
CamScanner

**Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP
com o nome do aluno**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

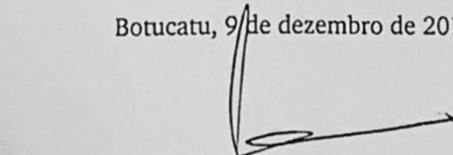


Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da toxicidade reprodutiva de anabolizantes em ratos Wistar machos adultos", Protocolo nº 938-CEUA, sob a responsabilidade de **Wilma De Grava Kempinas** e colaboração de **Ramão Souza de Deus Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 10/1/2017	Término: 28/02/2020
Espécie/linhagem:	Rato Wistar	
Nº de animais:	208	
Peso:	300g	Idade: 75 dias
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Biotério Central da Unesp-Câmpus de Botucatu	

Botucatu, 9 de dezembro de 2016.


Prof. Adj. Lucía Helena ODwyer de Oliveira
Vice-Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secdta@ibb.unesp.br



Scanned with
CamScanner

Scanned by CamScanner

Declaração de direitos autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE ANABOLIZANTES EM RATOS WISTAR ADULTOS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 05 de dezembro de 2019.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Ramão Souza de Deus Junior**
RG n.º 63575186

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Mary Anne Heidi Dolder**
RG n.º 31188420