

**EFEITO DO TRATAMENTO MATERNO COM O ESTERÓIDE ANABÓLICO DECA-
DURABOLIN SOBRE O OVÁRIO DE RATAS ADULTAS E PRODUTOS DA GESTAÇÃO
EFFECT OF THE MATERNAL TREATMENT WITH STEROID ANABOLIC
NANDROLONE DECANOATE ON THE OVARY OF ADULT FEMALE RATS AND
PREGNANCY OUTCOME**

Aline Miyuki Fujikawa e Isabel Cristina Cherici Camargo.

Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Av. Dom Antônio, 2100, CEP 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil. E-mail: alinebio18@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo do estudo foi analisar os efeitos promovidos pelo Decanoato de Nandrolona sobre a morfologia dos ovários das matrizes e sobre os produtos da gestação. Ratas do grupo tratado receberam o esteróide em uma única dose de 6 mg/kg de peso vivo por semana, durante 6 semanas. O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9%. As fêmeas de cada grupo foram acasaladas com machos e não tratados, para análise dos produtos da gestação. As gônadas foram processadas através da rotina histológica usual. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no peso corpóreo, e nos pesos ovariano, uterino e hepático entre as ratas controles e tratadas. As fêmeas androgenizadas apresentaram ciclo estral irregular. Nestas fêmeas, os ovários caracterizaram-se pela presença de corpos lúteos e folículos poliovulares, e extensas áreas com glândulas intersticiais no estroma. O tratamento materno com o esteróide reduziu a taxa de fecundidade e promoveu alterações morfológicas externas fetais. Concluiu-se que, nas condições experimentais, o tratamento androgênico afetou a estrutura gonadal das matrizes, a taxa de fecundidade e a morfologia externa fetal.

Palavras-chave: esteróide, ovários, histologia, ratas adultas, produtos da gestação.

Abstract

The goal of study was to analyze the effect promoted for the Nandrolone Decanoate on morphology of the ovaries of the matrizes and on the pregnancy outcome. Rats of the treated group received steroid in a single dose of 6 mg/kg of body weight, weekly, during 6 weeks. The group control received physiological solution 0.9%. The females of each group were coupled with not treated males, for analysis of the pregnancy outcome. The gonads were processed through the usual histological routine. It did not have significant difference ($p>0.05$) in the body weight, ovaries, uterus and liver between the treated and controls rats. The androgenized females presented irregular

estral cycle. In these females, the ovaries had characterized for the presence of corpus luteum and poliovular follicles, and extensive areas with interstitial glands in stroma. The maternal treatment with steroid reduced the fertility rate and promoted alterations in fetal morphology. Concluded that, in the experimental conditions, the androgenic treatment affected the gonadal structure of the matizes, the fertility rate and the fetal morphology.

Keywords: steroid, ovaries, histology, adult female rats, pregnancy outcome.

Introdução

O uso de esteróides anabólicos é uma prática comum entre jovens e adultos, atletas ou não. De acordo com CÍCERO & O' CONNOR (1990) *apud* LOVSTAKKEN *et al.* (1999), os esteróides anabólicos também estão associados ao uso abusivo de álcool, morfina e outras substâncias aditivas. Nos EUA, o mercado negro de esteróides anabólicos registrou um lucro líquido equivalente a US\$400 milhões por ano com estas drogas (LOVSTAKKEN *et al.*, 1999).

Os esteróides são compostos químicos sintéticos que imitam os efeitos anabólicos da testosterona (andrógeno pertencente à classe dos hormônios sexuais masculinos), apresentando a propriedade de ativar o metabolismo protéico através da retenção de nitrogênio e aumento da atividade do RNA (BLASBERG *et al.*, 1997). Quando administrados em altas doses, pode acarretar sérios riscos à saúde devido ao aumento no metabolismo basal, número de hemácias e capacidade respiratória. Tais alterações provocam uma redução na taxa de gordura corporal fazendo com que as pessoas que fazem uso dos esteróides ganhem força, potência e maior tolerância ao exercício físico. Estudos científicos mostram ainda que o seu uso inadequado pode levar a problemas cardíacos, hipertensão arterial, distúrbios psicológicos provocados pelo aumento da agressividade, hepatotoxicidade e redução nos níveis de hormônios sexuais (Esteróides Anabólicos, 2003).

Nos últimos anos, a Nandrolona tem sido um dos anabolizantes mais encontrados nos exames de doping. É precursora de outros esteróides no organismo humano, e quando presente na urina ou nos sais biliares, apresenta-se na forma glicoconjugada. O Comitê Olímpico Internacional estabeleceu as concentrações de corte de 2ng/mL e 5ng/mL para homens e mulheres, respectivamente, como parâmetro para a confirmação de administração exógena de Nandrolona. Mulheres grávidas podem apresentar alguns metabólitos de Nandrolona no fluido folicular ovariano e na placenta. A urina de mulheres que fazem uso do anticoncepcional Noretisterona pode também apresentar resíduos destes esteróides (MARQUES *et al.*, 2003).

Objetivos

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do tratamento materno com o esteróide anabólico Deca-Durabolin sobre a morfologia dos ovários das matrizes e sobre os produtos da gestação.

Metodologia

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, com aproximadamente 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central de Botucatu-UNESP. As fêmeas foram alojadas no Biotério da Faculdade de Ciências e Letras de Assis-UNESP, os quais foram mantidas em caixas de polipropileno forradas com maravalha, e permaneceram em ambiente padrão (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas), durante o período experimental. Ração comercial e água de torneira foram fornecidas *ad libitum*.

Aos 40 dias de idade, as fêmeas foram divididas casualmente em dois experimentos, constituídos de dois grupos de tratamento, controle (solução fisiológica) e tratado com o esteróide anabólico Deca-Durabolin®. As fêmeas do Experimento I foram destinadas ao estudo dos efeitos do esteróide sobre a morfologia gonadal, enquanto que as fêmeas do Experimento II foram destinadas ao estudo dos efeitos do tratamento androgênico materno sobre a análise dos produtos de gestação.

Nos experimentos I e II, as fêmeas foram tratadas com uma única injeção intraperitoneal de 6mg/kg de peso vivo de Deca-Durabolin, por semana, durante 6 semanas consecutivas. Os animais do grupo controle receberam solução salina no mesmo procedimento. De cada grupo, 10 fêmeas foram acasaladas com machos sexualmente maduros e não tratados, para análise dos produtos da gestação. As matrizes foram pesadas e foram coletados os ovários, útero, hipófise e fígado. As gônadas foram processadas através da rotina histológica usual, obtendo-se cortes de 5 μm de espessura, incluídos em Paraplast e corados com hematoxilina-eosina para análise em microscopia de luz.

Os fetos foram pesados em balança analítica AND – modelo HR200 e examinados ao estereomicroscópio da marca TecNival, para análise da morfologia externa. As imagens dos fetos provenientes de cada grupo de acasalamento foram captadas por câmera digital Canon A310, 3.2 megapixels.

Para a realização da análise estatística referente às variáveis de pesos corpóreo, ovariano, hipofisário e hepático das matrizes, foi utilizado o teste não-paramétrico de análise de variância de Mann-Whitney para o nível de 5% de significância, disponível no programa estatístico computacional “BioStat 3.0”. Utilizou-se o mesmo teste para análise estatística na determinação dos parâmetros referentes aos produtos de gestação. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Os resultados demonstraram que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do tratamento esteróide sobre os pesos corpóreo, ovariano, uterino, hipofisário e hepático das matrizes (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do tratamento androgênico sobre os parâmetros de peso corpóreo e pesos dos ovários, útero, hipófise e fígado das matrizes (valores da mediana).

PARÂMETROS	GRUPOS EXPERIMENTAIS	
	Controle	Tratado
Peso corpóreo (g)	268 a*	241 a
Peso dos ovários(g)	0,19 a	0,19 a
Peso do útero (g)	0,52 a	0,36 a
Peso da hipófise(g)	0,01 a	0,03 a
Peso do fígado (g)	11,48 a	11,48 a

* letras iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

A análise histológica revelou que houve um padrão estrutural da gônada, diferente entre as fêmeas dos grupos controle e tratado com o esteróide sintético.

As ratas controle apresentaram ovários contendo corpos lúteos bem desenvolvidos e folículos em diversos estágios de maturação (Fig. 1A). O corpo lúteo, formado após a ovulação, ocupa grande espaço no córtex ovariano, fazendo saliência na superfície do órgão (Fig. 1A). Esta estrutura apresenta-se morfologicamente constituída de grandes células luteínicas provenientes da granulosa e células menores luteínicas da teca interna. Estas células apresentam núcleo esférico e abundante citoplasma acidófilo (Fig. 1B).

Nas fêmeas tratadas, a alteração morfológica mais evidente nos ovários foi a presença de extensas áreas do estroma cortical com glândulas intersticiais (Fig. 2A). Estas estruturas caracterizam-se principalmente pelo aspecto cordonal de células semelhantes às células luteínicas, porém com volume nuclear e citoplasmático menor, sendo estes cordões separados por septos de tecido conjuntivo (Fig. 2B). Nas fêmeas deste grupo experimental verificou-se também a presença de corpos lúteos pouco desenvolvidos (Fig. 3A), maior frequência aparente de folículos poliovulares (Fig. 3B) e folículos atresícos. A atresia folicular, observada predominantemente nos ovários das ratas tratadas com o esteróide, é caracterizada estruturalmente pela degeneração do ovócito, desorganização das células da granulosa e invasão de núcleos picnóticos de células foliculares para o interior do antro (Fig.4A). Nestas ratas também evidenciou-se várias células metafásicas na parede folicular (Fig.4B).

No grupo controle, a citologia esfoliativa confirmou a ciclicidade estral das fêmeas, as quais apresentaram estro típico caracterizado pela grande quantidade de células acidófilas e queratinizadas no esfregaço (Fig. 5A).

Com base na citologia esfoliativa, as fêmeas tratadas apresentaram ausência de ciclicidade estral, com persistência da fase de metaestro, caracterizada pela presença predominante de células epiteliais pequenas, arredondadas e nucleadas, algumas células queratinizadas, muco e leucócitos (Fig. 5B). No grupo tratado com o esteróide a taxa de fecundidade foi de 10% e no grupo controle foi de 100%.

Em ambos grupos experimentais, verificou-se que a gônada apresenta um revestimento epitelial do tipo cúbico simples, sendo que abaixo deste, há uma camada de tecido fibroso, a túnica albugínea. As regiões cortical e medular apresentaram-se distintas. A região central do órgão, a medula, é constituída por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado (Fig. 1A). No córtex, foram evidenciados numerosos folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento. O córtex é constituído por um tecido conjuntivo fibrocelular, que caracteriza o estroma ovariano (Fig. 1A).

A avaliação morfológica externa fetal, em cada grupo de acasalamento, permitiu verificar que os fetos provenientes de fêmeas androgenizadas apresentaram tegumento de aspecto gelatinoso e edematoso (Fig. 6). O tratamento materno com o esteróide anabólico androgênico também resultou na obtenção de uma progênie heterogênea, com fetos de tamanhos diferentes.

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com aqueles descritos por BLASBERG *et al.* (1997) que relataram o efeito não significativo do Decanoato de Nandrolona sobre o peso corpóreo de ratas tratadas diariamente com o esteróide anabólico nas doses de 5,6, 0,56 e 0,056 mg/kg, durante 2 semanas. O período de tratamento (6 ou 12 semanas) e a alta (2,20 mg/kg) ou baixa dose (0,55 mg/kg) do esteróide da marca comercial “Equipoise” (Lab. Squibb), não afetaram o ganho de peso das ratas (HOWE & MORELLO, 1985). No entanto, LEWANOWITSCH & IRVINE (2001) e GEREZ *et al.* (2005) verificaram que as fêmeas androgenizadas, tratadas com Decanoato de Nandrolona, apresentaram significativamente maior peso corpóreo que as ratas controles.

A ausência de diferença significativa nos pesos ovariano e uterino de ratas tratadas e controles, obtida neste estudo, é concordante com os resultados relatados por GAO & SHORT (1993) e GEREZ *et al.* (2005). Outros autores (BRONSON, 1996; BRONSON *et al.*, 1996) descreveram que os pesos dos ovários e útero são afetados pela administração de esteróides anabólicos.

O decréscimo no peso da hipófise em fêmeas tratadas com esteróide foi descrito por vários autores (GAO & SHORT, 1993; BRONSON *et al.*, 1996). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento de ratas com o Decanoato de Nandrolona (Deca-Durabolin), não

afetou o peso hipofisário. Este resultado concorda com aquele obtido por BLASBERG *et al.* (1997) em ratas da linhagem Long–Evans, e por GEREZ *et al.* (2005), em ratas da linhagem Wistar.

Embora no presente estudo não houve efeito significativo do tratamento esteróide sobre o peso hepático, GEREZ *et al.* (2005) verificaram que o peso do órgão foi significativamente alterado em função do tratamento androgênico de fêmeas, durante a fase adulta.

As discrepâncias nos resultados obtidos neste estudo e de outros autores se devem às diferentes espécies e linhagens, tipos de esteróides anabólicos e doses empregadas nos estudos animais. Também, na maioria dos estudos, o tratamento androgênico é realizado em fêmeas adultas, sexualmente maduras, e neste estudo o tratamento teve início na fase pré-púbere ou juvenil da rata (40 dias) e estendeu-se até a fase adulta (75 dias).

Embora o uso abusivo de esteróides anabólicos androgênicos (EAA) ocorre em homens e mulheres, são poucos os estudos publicados sobre os efeitos dos EAA sobre a morfologia de órgãos reprodutores femininos (GIANNINI *et al.*, 1991; BOND *et al.*, 1995; CORRIGAN, 1996), embora a abordagem fisiológica e comportamental é bem relatada. De acordo com SQUIRES *et al.* (1982) e HOWE & MORELLO (1995), o uso de esteróides anabólicos induz modificações no comportamento, caracterizadas pela agressividade excessiva observada nas ratas. No presente estudo, não foi comprovado este resultado, uma vez que não houve índice de mortalidade.

A alteração da atividade cíclica ovariana, observada nas ratas tratadas do Experimento I, com 6mg/kg de Deca-Durabolin, foi esperada, já que estudos anteriores descreveram que em roedores e humanos, os componentes de anabólicos esteróides androgênicos rompem a função neuroendócrina da fêmea (SQUIRES *et al.*, 1982; GAO & SHORT, 1993; BRONSON, 1996; BLASBERG *et al.*, 1997). Segundo os autores, os componentes EAA alteram a função do axis hipotálamo-hipófise-gônada. Os altos níveis de andrógeno circulantes podem suprimir o feed-back negativo e por meio disto, reduzir a liberação de gonadotrofinas. Como consequência, a secreção de estrógeno pelos ovários seria impedida ou reduzida. Poderia ser sugerido que, indiretamente os baixos níveis de estrógeno circulantes produziram o padrão de metaestro observado nas fêmeas tratadas com o Deca-Durabolin. Embora neste estudo não foi realizada a determinação dos níveis hormonais nas ratas, este parâmetro poderia auxiliar no entendimento da dinâmica do controle neuroendócrino, em resposta ao nível de Decanoato de Nandrolona utilizado.

As mulheres que fazem uso próprio de componentes de EAA poderiam apresentar distúrbios no ciclo menstrual (BLASBERG *et al.*, 1997), comparativamente às ratas tratadas com Deca-Durabolin neste estudo.

O exame histológico dos ovários das ratas tratadas com Deca-Durabolin revelou um efeito deletério do esteróide sobre a gônada. A atresia folicular verificada nos ovários, a presença de folículos poliovulares, resultantes provavelmente de uma divisão meiótica anormal, e a presença

abundante de glândulas intersticiais, colaboram com os relatos de vários autores (SQUIRES *et al.*, 1982; GAO & SHORT, 1993; BRONSON, 1996; BLASBERG *et al.*, 1997), de que os esteróides anabólicos influenciam a função do axis neuroendócrino feminino. Ainda que, os ovários das ratas tratadas apresentaram corpos lúteos pouco desenvolvidos, acredita-se que a droga promoveu redução na liberação de gonadotrofinas hipofisárias, influenciando a formação de estruturas luteínicas.

De acordo com ROSS & ROMRELL (1993), em alguns folículos atrésicos ocorre um aumento das células da teca interna, que se organizam em cordões radiais separados por tecido conjuntivo, se assemelhando a um antigo corpo lúteo, denominado corpo lúteo atrésico. Estes cordões de células luteínicas fragmentam-se e se espalham no estroma formando parte da chamada glândula intersticial do ovário. Como pôde ser verificado neste estudo, a droga induziu à formação de muitas glândulas intersticiais nos ovários das ratas.

O desempenho reprodutivo foi reduzido nas fêmeas tratadas com o esteróide anabólico. Verificou-se que 100% das ratas controles ficaram prenhes e 10% das ratas tratadas. Este resultado é concordante com aqueles obtidos por GAO & SHORT (1993).

O tratamento materno com o Deca-Durabolin no período pré-gestacional não promoveu defeitos anatômicos na estrutura corpórea fetal, no entanto, o revestimento cutâneo foi alterado, o qual apresentou aspecto gelatinoso. Resultados semelhantes foram verificados por FERACINI *et al.* (2006), onde os fetos apresentaram estrutura cutânea com descamação, principalmente na região lateral, dorsal e cefálica.

Conclusões

Concluiu-se que, nas condições experimentais, o tratamento androgênico promoveu aciclicidade estral e afetou a estrutura gonadal das matrizes, a taxa de fecundidade e a morfologia externa fetal.

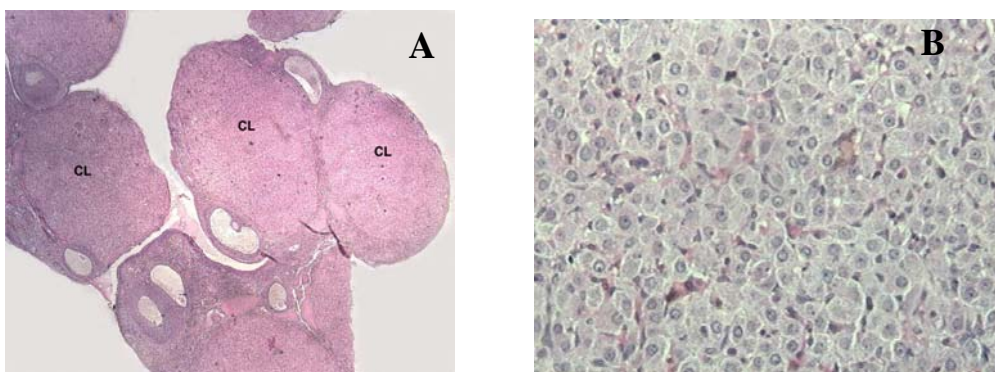


Figura 1 – Secção histológica de ovário de rata do grupo controle. Em A, são evidenciados corpos lúteos (CL) bem desenvolvidos. Em B, são evidenciadas células luteínicas. HE.

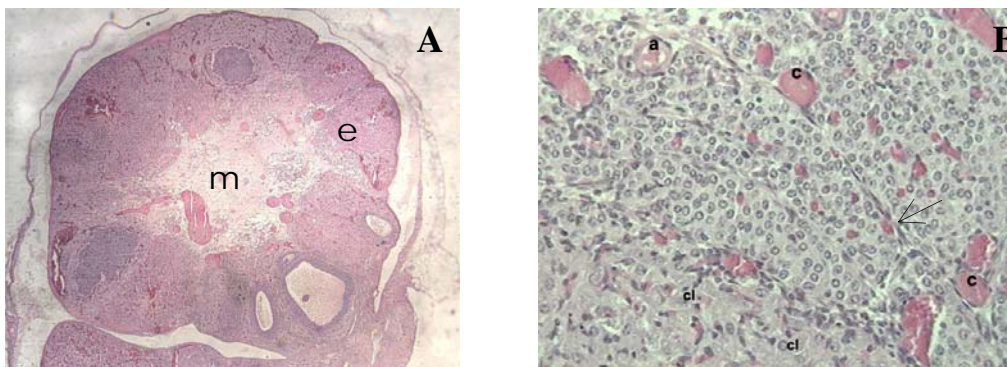


Figura 2 – Em A (obj.4x), observar a presença de glândulas intersticiais, que ocupam extensas áreas no estroma cortical (e). A medula (m) apresenta-se de aspecto frouxo e ricamente vascularizada. Em B (obj.20x), é dado destaque à característica morfológica da glândula intersticial. São evidenciados: septos conjuntivos (setas), arteríola (a), capilares sanguíneos (c) e células luteínicas (cl). HE.

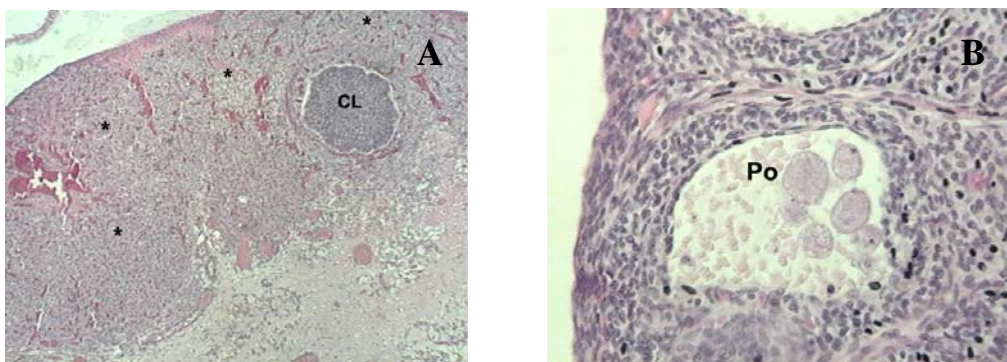


Figura 3 – Detalhes das alterações nos ovários das fêmeas tratadas com esteróide. São evidenciados: corpo lúteo (CL) pouco desenvolvido, glândulas intersticiais (*) e folículo poliovular (Po). A (obj.4x); B (obj.20x).HE.

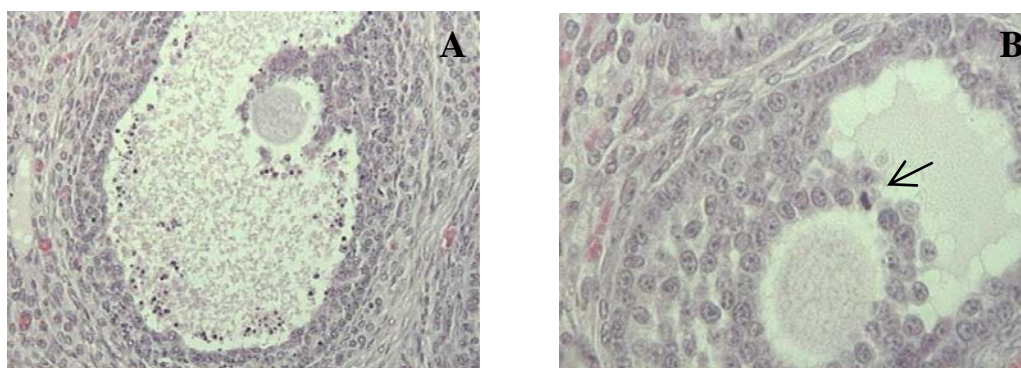


Figura 4 – Secção histológica de ovário de rata tratada com esteróide. Em A (obj.20x) é evidenciado folículo antral em processo de atresia com núcleos picnóticos no interior do antro. Em B (obj.40x) é evidenciado folículo antral do tipo 7 contendo célula metafásica (seta) circundando o ovócito. HE.

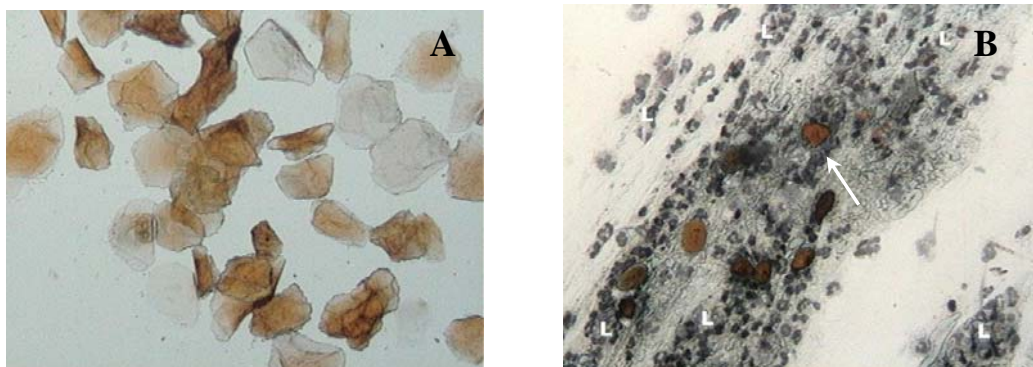


Figura 5 – Citologia esfoliativa vaginal de ratas dos grupos controle (A) e tratado com esteróide (B). Em A, são evidenciadas células queratinizadas típicas da fase de estro, e em B, são evidenciados leucócitos (L) e células epiteliais arredondadas (setas) típicas da fase de metaestro. Shorr/H, obj.20x.



Figura 6 - Fetos provenientes de matrizes controle (A, B) e matrizes tratadas (C, D). Verificar o aspecto edematoso cutâneo e a morfologia fetal em C e D, diferentes de A e B.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro em forma de bolsa de Iniciação Científica. Também agradecem à Maria Isabel de Oliveira, Milena dos Santos Esteves, Allan Fernando de Paula, Danilo Samuel Lopes Feracini e Fernando Frei pela colaboração.

Referências bibliográficas

- BLASBERG, M.E., LANGAN, C.J., CLARK, A.S. The effects of alphamethyltestosterone, methandrostenolone and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle. *Physiol Behav.*, v.61, p.265-272, 1997.
- BOND, A. J., CHOI, P. Y. L., POPE, H. G. Assessment of attentional and mood in users and non-users of anabolic-androgenic steroid. *Drug alcohol*, v. 37, p 241-245, 1995.
- BRONSON, F.H. Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.53, p. 329-334, 1996.

- BRONSON, F.H.; NGUYEN, K.Q.; DE LA ROSA, J. Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. *Physiol Behav.*, v.59, p. 49-55, 1996.
- CÍCERO, T.J.; O'CONNOR, L.H. Abuse of anabolic steroids and their possible role in the abuse of alcohol, morphine, and other substances. *Nat. Inst. Drug Abuse Res. Monog. Series*, v.102, p. 1-28, 1990.
- CORRIGAN, B. Anabolic steroids and the mind. *Med. J. Aust.*, v. 165, p. 222-226, 1996
- GAO, Y. ; SHORT, R.V. Use of an oestrogen, androgen or gestagen as a potential chemosterilant for control of rat and mouse populations. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.97, p. 39-49, 1993.
- GEREZ, J.R., FREI, F., CAMARGO, I.C.C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats submitted to nandrolone decanoate treatment. *Contraception*, v. 72, p. 77-80, 2005.
- GIANNINI, A.J., MILLER, N., KOCJAN, D. K. Treating steroid abuse. *Clin. Ped.*, v. 30, p. 538-542, 1991.
- HOWE, G.R., MORELLO, C, J. Effects of an anabolic steroid on reproduction in female rats. *Steroid*, v.45, p. 495-501, 1985.
- LEWANOWITSCH, T., IRVINE, R.J. Effects of testosterone propionate and nandrolone on body composition and lipoprotein concentrations in the rat. *Addiction Biology*, v.6, p. 55-61, 2001.
- LOVSTAKKEN, K., PETERSON, L., HOMER, A.L. Risk factors for anabolic steroid use in college students and the role of expectancy. *Addic. Behav.*, v.24, p. 425-430, 1999.
- MARQUES, M.A.S., PEREIRA, H.M.G., NETO, F.R.A. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.*, v.9.n.1, Niterói, 2003.
- PADMANABHAN, V., MANIKKAM, M., RECABARREN, S., FOSTER, D. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Molecular and Cellular Biology*, v. 246, p. 165-174, 2006.
- ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. *Histologia Texto e atlas*, 2a. edição. Panamericana, 1993.
- SQUIRES, E.L.; TODTER, G.E.; BERNDTSON, W.E.; PICKETT, B.W. Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallions. *J. Animal Sci.*, v.54, p. 576-582, 1982.