

Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas

CDD. 20.ed. 796.022

Paulo Roberto Gasparini PAVÃO*
Álison Marques de Miranda Cabral GONTIJO*
Daniel Araki RIBEIRO*
Daisy Maria Favero SALVADORI*

*Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

Resumo

Os esteróides anabolizantes vêm sendo utilizados indiscriminadamente com a finalidade de aumentar a massa muscular e melhorar o desempenho em competições esportivas. No entanto, os efeitos desses esteróides sobre a saúde humana foram pouco avaliados. O presente estudo propôs verificar o potencial genotóxico de esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas utilizando o teste do cometa, capaz de detectar lesões primárias no DNA. Para isso, foram coletadas amostras de sangue periférico de 63 voluntários, sendo 23 praticantes do fisiculturismo não competitivo e usuários de esteróides anabolizantes; 20 fisiculturistas não usuários dos esteróides e 20 indivíduos sedentários, que não praticavam exercício físico rotineiro (grupo controle). Nos protocolos de tratamento utilizados pelos usuários de esteróides estavam inclusos: o stanozolol, o decanoato de nandrolona, o cipionato de testosterona e a oximetolona. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) nos níveis de danos no DNA ("tail moment") entre os grupos avaliados. Desta forma, conclui-se que o treinamento físico de força muscular, bem como o uso de esteróides anabolizantes durante o treinamento físico não induziram aumento de danos no DNA de leucócitos do sangue periférico.

UNITERMOS: Esteróides anabolizantes; Exercícios anaeróbios; Genotoxicidade; Teste do cometa.

Introdução

Nas últimas décadas, o treinamento de força vem ganhando destaque como parte integrante da prescrição de exercícios visando a saúde. Esse aumento de interesse ocorreu especialmente após o American College of Sports Medicine (ACSM) ter ressaltado os benefícios desse tipo de treinamento e de suas formas de aplicação em relação à frequência semanal, número de séries, intervalo entre as séries, número de repetições e número de exercícios (SIMÕES, 2003). O treinamento de força foi sempre associado ao aumento de massa muscular, sendo um meio para atingir uma hipertrofia adequada, no caso do fisiculturismo, e para o aumento de força máxima e potência muscular, importante para muitos esportes (UCHIDA, CHARRO, BACURAU, NAVARRO & PONTES JÚNIOR, 2003).

O fisiculturismo, que consiste na prática regular de exercícios anaeróbios de força para a modelagem

e definição muscular, vem crescendo bastante como esporte. No entanto, com o objetivo de aumentar o processo anabólico celular, o crescimento muscular e a subsequente melhoria no desempenho físico em curtos intervalos de tempo, alguns praticantes tanto de exercícios físicos anaeróbios como aeróbios vêm fazendo uso indiscriminado de esteróides anabolizantes (KICMAN & GOWER, 2003).

Os esteróides anabolizantes são derivados do hormônio sexual masculino testosterona, secretada pelos testículos (FARRELL & MCGINNIS, 2003; YESALIS & BAHRKE, 2002) e responsável pelas características físicas masculinas (FARRELL & MCGINNIS, 2003). Dentre os efeitos deletérios que podem ser causados pelos anabolizantes sintéticos estão agressividade (BRONSON, 1996; FARRELL & MCGINNIS, 2003), atrofia testicular, ginecomastia,

alterações na próstata e vesícula seminal, alterações no ciclo menstrual, alterações no crescimento, cistos hepáticos, hepatoma (BROEDER, 2003; BRONSON, 1996; COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS, 1990; YEASALIS & BAHRKE, 2002) e alterações cardiovasculares (SCHARHAG, URHAUSEN & KINDERMANN, 2003; SULLIVAN, MARTINEZ & GALLACHERM 1999).

O teste do cometa é um ensaio simples, rápido, sensível e de baixo custo quando comparado a outros testes para detecção de danos genéticos. Esta técnica consiste na imersão de células viáveis em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos, e posterior eletroforese (SINGH, MCCOY, TICE & SCHNEIDER, 1988). Sob condições alcalinas de eletroforese, as células com danos no DNA apresentam maior taxa de migração da molécula em direção ao ânodo devido a quebras de fita simples ou dupla e

sítios lábeis alcalinos (OLIVE, BANATH & DURAND, 1990), simulando a aparência de um cometa (cabeça e cauda). Embora alguns estudos tivessem mostrado um aumento de danos no DNA em indivíduos praticantes de exercícios físicos aeróbicos (HARTMANN, PLAPPERT, RADDATZ, GRUNERT-FUCHS & SPEIT 1994; MASTALOUDIS, YU, O'DONNELL, FREI, DASHWOOD & TRABER, 2004), não há, até o momento, trabalhos que demonstrem a frequência de danos primários no DNA em células do sangue periférico de atletas que realizam treinamento físico de força muscular, tampouco de atletas usuários de esteróides anabolizantes.

Com base no exposto, este estudo utilizou o teste do cometa para avaliar o potencial genotóxico de esteróides anabolizantes em indivíduos praticantes de musculação e fisiculturismo.

Material e métodos

Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu, SP (Protocolo no. 262/99-CEP).

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 63 voluntários do sexo masculino, sendo 23 praticantes do fisiculturismo e usuários de esteróides anabolizantes (média de idade $22,7 \pm 3,61$) e 20 fisiculturistas não usuários de esteróides (média de idade $24,0 \pm 4,70$), sob treinamento há no mínimo de 12 meses, em academias de musculação de Bauru, Botucatu, Manduri, Avaré, Pardinho e São Paulo - SP. A intensidade média do treinamento de musculação no período da coleta do sangue para análise era de 80% a 95% da carga máxima de cada indivíduo e o tempo de treinamento dos atletas era superior a 12 meses. As sessões, no mínimo de três por semana, tinham duração de 90 a 120 minutos, sendo os treinos divididos por grupos musculares. Todos os atletas estavam em fase de hipertrofia (treinamentos específicos para o aumento da massa muscular com cargas entre 80% a 90% da carga máxima do atleta), ou treinamento de força (treinamento voltado para o ganho de força muscular com cargas entre 90% a 95% da carga máxima do atleta). O grupo controle consistiu de 20 indivíduos sedentários (média de idade $21,9 \pm 3,18$), que não praticavam exercícios físicos rotineiros, pareados por idade com o grupo de praticantes. A todos os indivíduos foi aplicado um questionário inquirendo

sobre dados pessoais, informações gerais (tabagismo, uso de substâncias tóxicas e álcool); história médica (uso de medicamentos, exposição à radiação), programa de treinamento físico (tipos de exercícios, período de treinamento) e protocolo do ciclo de esteróides. Foram excluídos da amostra indivíduos tabagistas ou ocupacionalmente expostos a contaminantes ambientais (agrotóxicos, tintas, etc) e aqueles que não utilizam ciclos regulares de esteróides anabolizantes.

Ciclo de esteróides e coleta de sangue

Os protocolos, que já vinham sendo utilizados pelos fisiculturistas por ocasião do estudo, incluíam os seguintes esteróides anabolizantes: o stanozolol (Winstrol® Depot, Zambon), o decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Organon), o cipionato de testosterona (Deposteron®, Sigma Pharma Ltda), a oximetolona (Hemogenin®, Aventis Pharma) e a combinação de decanoato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e propionato de testosterona (Durateston®, Organon) (TABELA 1). Esses compostos eram administrados por injeção intramuscular, em ciclos de oito a 12 semanas, em doses crescentes que variavam de atleta para atleta. A amostra de sangue periférico (aproximadamente 20 µl/indivíduo) foi coletada no pico da dosagem dos esteróides, por perfuração da falange do dedo indicador, utilizando-se material descartável.

TABELA 1 - Esteróides anabolizantes utilizados pelos indivíduos praticantes de fisiculturismo.

Indivíduo	Idade	Esteróide
1	27	CT
2	20	OXL
3	23	STZ
4	26	STZ
5	18	STZ
6	24	DN, STZ
7	20	DFIPT, STZ
8	26	STZ
9	19	DN
10	27	STZ
11	29	STZ
12	30	STZ
13	23	STZ
14	19	STZ
15	19	STZ
16	23	OXL
17	20	STZ
18	19	STZ
19	22	DN
20	18	STZ
21	23	STZ
22	22	STZ
23	26	CT
Média \pm DP	22,7 \pm 3,61	

CT - cipionato de testosterona (Deposteron, Sigma Pharma Ltda); DN - decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin, Organon); DFIPT - combinação de decanoato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e propionato de testosterona (Durateston, Organon); OXL - oximetolona (Hemogenin, Aventis Pharma); STZ - stanozolol (Winstrol Depot, Zambon).

Teste do cometa

O teste do cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por TICE, AGURELL, ANDERSON,

Resultados e discussão

A FIGURA 1 apresenta os resultados do teste do cometa em células de sangue periférico dos grupos de indivíduos investigados. Além da ausência de efeito genotóxico induzido pelos esteróides anabolizantes, os resultados mostram que o treinamento físico de força muscular praticado pelos fisiculturistas não induziu

BURLINSON, HARTMANN, KOBAYASHI, MIYAMAE, ROJAS, RYU e SASAKI (2000). Em resumo, uma alíquota (5 μ l) de sangue periférico foi misturada a 120 μ l de agarose de baixo ponto de fusão e transferida para duas lâminas recém-preparadas com uma camada de agarose. Essas lâminas foram colocadas em uma cuba contendo solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, sarcosinato de sódio 1%, Triton X-100 1%, pH 10 e DMSO 10%, adicionado no momento do uso) e deixadas por 24 h à 4 °C. Após esse período, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo solução tampão alcalina (300 mM NaOH e 1mM EDTA à 4 °C) e deixadas por 30 minutos antes de proceder a eletroforese a 25V e 300 mA, por outros 20 minutos. As lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e lavadas em solução de neutralização (Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol 100% e coradas com brometo de etídio (20 μ g/ml em H₂O destilada; 50 μ l/lâmina) no momento da análise. Foram analisadas 50 células por indivíduo, em aumento de 400 X, utilizando-se microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (COMET ASSAY II, da Perceptive Instruments, Suffolk, UK). O parâmetro densitométrico considerado para a avaliação dos danos no DNA foi o "tail moment", que é produto do comprimento da "cauda do cometa" *versus* a porcentagem de DNA contido na "cauda" (HARTMANN, AGURELL, BEEVERS, BRENDLER-SCHWAAB, BURLINSON, CLAY, COLLINS, SMITH, SPEIT, THYBAUD & TICE, 2003).

Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de 5% (programa estatístico Sigma Stat 1.0, Jadel Scientific, Chicago, IL, USA).

lesões genéticas, uma vez que o índice de danos no DNA dos não usuários de esteróides não foi estatisticamente diferente daquele do grupo controle. Em contrapartida, HARTMANN, NIEß, GRÜNERT-FUCHS, POCH e SPEIT (1995) observaram um aumento na frequência de danos no DNA de indivíduos que

realizavam treinamento físico aeróbico. Tal achado poderia ser explicado pelas lesões oxidativas causadas

pelos radicais livres de oxigênio gerados durante o treinamento físico aeróbico (SEN, 2001).

Os valores são expressos como média + desvio padrão. $P > 0,05$.

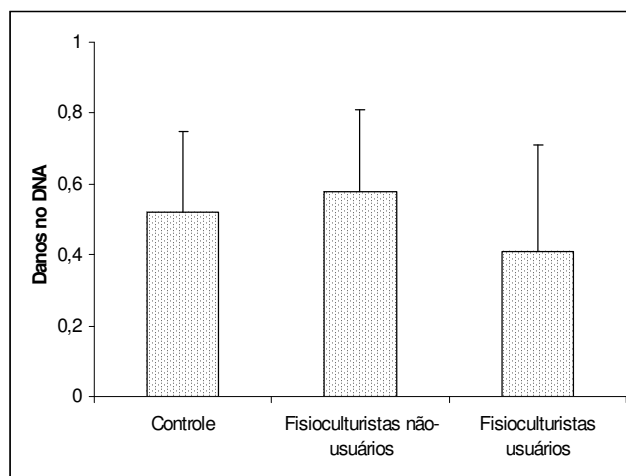


FIGURA 1 - Danos no DNA (“tail moment”) avaliados pelo teste do cometa em leucócitos do sangue periférico de indivíduos praticantes de musculação e fisioculturismo, usuários de esteróides anabolizantes.

Mesmo proibido por associações esportivas, os esteróides anabolizantes vêm sendo utilizados por alguns atletas fisiculturistas em doses supra-fisiológicas, ultrapassando de 10 a 40 vezes àquelas indicadas para o medicamento (VAN BREDÁ, KEIZER, KUIPERS & WOLFFENBUTTEL, 2003). Um aspecto importante no uso desses esteróides é a elaboração dos ciclos de administração dos hormônios. A combinação das várias substâncias para compor tais ciclos faz com que os efeitos colaterais superem, em muito, quaisquer benefícios potenciais pelo tratamento com esteróides (MCARDLE, KATCH & KATCH, 1992). Embora já se conhecesse alguns dos efeitos deletérios causados pelos anabolizantes sintéticos (BROEDER, 2003; FARRELL & MCGINNIS, 2003; SCHARHAG, URHAUSEN & KINDERMANN, 2003; YEASALIS & BAHKE, 2002), não havia até o momento estudos demonstrando o efeito do treinamento físico de força muscular e uso de esteróides

anabolizantes em cooperação com o treinamento físico no material genético (DNA).

Não há dúvida de que os mecanismos e as consequências da genotoxicidade induzida por agentes químicos envolvem processos complexos. Recentemente, MOLLER, KNUDSEN, LOFT e WALLIN (2001) mostraram que a idade, os processos inflamatórios e o tabagismo são fatores que podem interferir nos resultados do teste do cometa em células de sangue periférico. Desta forma, no presente estudo foram tomados cuidados para que as variáveis idade, estilo de vida e hábitos alimentares não influenciassem nos níveis de lesões no DNA dos diferentes grupos.

Concluindo, o uso de esteróides anabolizantes, bem como o treinamento físico de força muscular realizado pelos fisiculturistas voluntários deste estudo, não induziram aumento de danos no DNA de leucócitos do sangue periférico detectáveis pelo teste do cometa.

Abstract

Lack of genotoxicity induced by steroids anabolic in bodybuilding practitioners

Anabolic steroids have been used in order to increase muscular mass and to improve the performance in sporting competitions. The aim of the present study was to evaluate the genotoxic effect of anabolic steroids in bodybuilders, using the comet assay that is able to detect primary DNA damage. Peripheral blood samples were collected from 63 volunteers: 23 bodybuilders and anabolic steroids-users; 20

bodybuilders-non-steroids users; and 20 sedentary individuals, who did not practice any physical exercise (control group). The used anabolic steroids included: stanozolol, nandrolone decanoate, testosterone cypionate, oxymetholone and a combination of testosterone decanoate, testosterone phenylpropanate, testosterone isocaproate and testosterone propionate. The results showed no statistically significant difference ($P > 0.05$) in the level of DNA damage (tail moment) among the groups. In conclusion, these results suggest that the anabolic steroids, as well as resistance training (bodybuilding) did not induce increase of DNA damage in peripheral blood leukocytes.

UNITERMS: Anabolic steroids; Resistance training; Comet assay; Genotoxicity.

Referências

- BROEDER, C.E. Oral andro-related prohormone supplementation: do the potential risks outweigh the benefits? *Canadian Journal of Applied Physiology*, Champaign, v. 28, p.102-16, 2003.
- BRONSON, F.H. Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Phoenix, v.53, p.329-34, 1996.
- COUNCIL ON SCIENTIFIC AFFAIRS. Medical and nonmedical uses of anabolic-androgenic steroids. *JAMA*, Chicago, v.264, p.2923-7, 1990.
- FARRELL, S.F.; MCGINNIS, M.Y. Effects of pubertal anabolic-androgenic steroid (AAS) administration on reproductive and aggressive behaviors in male rats. *Behavioral Neuroscience*, Washington, v.117, p.904-11, 2003.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, Oxford, v.18, p.45-51, 2003.
- HARTMANN, A.; NIEß, A.M.; GRÜNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Research*, Oxford, v.346, p.195-202, 1995.
- HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; RADDATZ, K.; GRUNERT-FUCHS, M.; SPEIT, G. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, Oxford, v.9, p.269-72, 1994.
- KICMAN, A.T.; GOWER, D.B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Annals of Clinical Biochemistry*, London, v.40, p.321-56, 2003.
- MASTALOUDIS, A.; YU, T.W.; O'DONNELL, R.P.; FREI, B.; DASHWOOD, R.H.; TRABER, M.G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v.15, p.966-75, 2004.
- McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- MOLLER, P.; KNUDSEN, L.E.; LOFT, S.; WALLIN, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, London, v.9, p.1005-15, 2000.
- OLIVE, P.L.; BANATH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Research*, New York, v.122, p.86-94, 1990.
- SCHARHAG, J.; URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Anabolic steroid-induced echocardiographic characteristics of professional football players? *Journal of American College of Cardiology*, New York, v.42, p.588-9, 2003.
- SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Medicine*, Auckland, v.31, p.891-908, 2001.
- SIMÕES, R. *Fundamentos fisiológicos para o treinamento de força e potência*. São Paulo: Phorte, 2003.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, New York, v.175, p.184-91, 1988.
- SULLIVAN, M.L.; MARTINEZ, C.H.; GALLAGHER, E.J. Atrial fibrillation and anabolic steroids. *Journal of Emergency Medicine*, New York, v.17, p.851-7, 1999.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, New York, v.35, p.206-21, 2000.

UCHIDA, M.C.; CHARRO, M.A.; BACURAU, R.F.P.; NAVARRO, F.; PONTES JÚNIOR, F.L. **Manual de musculação:** uma abordagem teórico-prática ao treinamento de força. São Paulo: Phorte, 2003.

VAN BREDÁ, E.; KEIZER, H.A.; KUIPERS, H.; WOLFFENBUTTEL, B.H.; Androgenic anabolic steroid use and severe hypothalamic-pituitary dysfunction: a case study. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.24, p.195-6, 2003.

YESALIS, C.E.; BAHRKE, M.S. Anabolic-androgenic steroids and related substances. **Current Sports Medicine Reports**, Philadelphia, v.1, p.246-52, 2002.

ENDEREÇO

Daisy Maria Favero Salvadori
Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina
Universidade Estadual Paulista
Distrito de Rubião Junior s/n
18618-000 - Botucatu - SP - BRASIL
e-mail: dfavero@fmb.unesp.br

Recebido para publicação: 27/04/2005

Revisado: 11/05/2007

Aceito: 20/06/2007