

JESUINO RAFAEL MACHADO FERREIRA

EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTEROIDE
ANABOLIZANTE ANDROGÊNICO SOBRE O PERFIL
REDOX DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2018

Trabalho realizado no Departamento de Biociências da Atividade Física, da Escola de Educação Física e Desportos, UFRJ, sob a orientação da Professora Verônica Salerno Pinto e coorientação de Stephan Pinheiro Frankenfeld.

CIP - Catalogação na Publicação

F383e Ferreira, Jesuino Rafael Machado
 EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTEROIDE ANABOLIZANTE
 ANDROGÊNICO SOBRE O PERFIL REDOX DO TECIDO HEPÁTICO
 E RENAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS / Jesuino Rafael
 Machado Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2018.
 66 f.

 Orientadora: Verônica Pinto Salerno.
 Coorientadora: Stephan Pinheiro Frankenfeld.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2018.

 1. Ovariectomia. 2. Decanoato de Nandrolona. 3.
 Estresse Oxidativo. I. Salerno, Verônica Pinto,
 orient. II. Frankenfeld, Stephan Pinheiro,
 coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JESUINO RAFAEL MACHADO FERREIRA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTEROIDE ANABOLIZANTE ANDROGÊNICO
SOBRE O PERFIL REDOX DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2018

(Alessandra D'Almeida Filardy, Doutora e IMPPG)

(Luciane Cláudia Barcellos, Doutora e EEFD)

(Camila Victória Sousa Oliveira, Mestre e IMPPG)

(Walter Martín Roland Oelemann, Doutor e IMPPG)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jesuino e Romilda pelo grande apoio em toda a minha jornada, tanto no âmbito acadêmico quanto no pessoal. Muito Obrigado pois nada seria sem vocês.

Aos professores Verônica Salerno e Stephan Frankenfeld pela oportunidade e também confiança e amizade e por serem meus grandes guias na pesquisa científica.

Ao meu namorado Claudio pelo companheirismo, paciência e dedicação.

Aos colegas do LaBEMMol, Bruna Piazero, Camilli Santos, Michele Xavier, Everton Luis, Diego Viana, Victor Machado, Fábio Cahuê e Leandro Côrrea pela grande ajuda em procedimentos científicos e por terem me ensinado muito sobre ciência e por tornarem o laboratório alegre e um lugar ótimo de trabalho.

As minhas amigas Antônia Ferreira, Caroline Frere, Leticia Ferreira e Kobayé Dedji pela amizade, companheirismo e as horas intermináveis de estudo e preparação de trabalhos.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e ao corpo docente do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes pela educação de excelência e qualidade.

Aos funcionários da secretaria de microbiologia (UFRJ), muito obrigado.

Ao PIBIC/UFRJ pela bolsa concedida.

RESUMO

Jesuino Rafael Machado Ferreira

EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTEROIDE ANABOLIZANTE ANDROGÊNICO SOBRE O PERFIL REDOX DO TECIDO HEPÁTICO E RENAL EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Orientadora: Verônica Salerno Pinto

A ausência dos hormônios ovarianos pode levar a diversas alterações metabólicas. A ovariectomia é o modelo usado para estudar as alterações causadas pela perda de função ovariana e redução na secreção de estradiol. A testosterona pode ser uma alternativa a reposição hormonal por ser menos hepatotóxica e as modificações farmacológicas dessa molécula reduzem os efeitos colaterais quando usados em doses baixas não alterando o equilíbrio redox. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito de diferentes doses de Esteroide Anabolizante Androgênico (EAA, Decanoato de Nandrolona) no balanço redox no tecido hepático e renal de ratas ovariectomizadas. **MÉTODOS:** Ratas Wistar fêmeas (n = 33) foram divididas em cinco grupos: controle (C) e quatro grupos de ratas ovariectomizadas aos 60 dias de idade tratados por 8 semanas sem (OVX) ou com EAA a cada 15 dias a 0,1 mg/kg (OVX1), 3 mg/kg (OVX3) e 10 mg/kg (OVX10). Homogenato de tecido hepático ou renal foram usados para as dosagens bioquímicas e o plasma e para marcadores de lesão tecidual e dosagem de TGC. Os dados foram analisados por one-way ANOVA usando software GraphPad Prism ($P \leq 0,05$ foi considerado significativo). **RESULTADOS:** Os grupos OVX apresentaram redução significativa no peso do útero em relação ao C. Os depósitos de gordura retroperitoneal apresentaram aumento nos grupos OVX e OVX1 em relação ao C. Podemos verificar um aumento significativo no peso do coração no grupo OVX10 em relação ao C. Não foram encontradas alterações nos biomarcadores de lesão celular CK, LDH, ALT, AST e GGT. No entanto, a CK-MB foi alterada no grupo OVX3, bem como, a quantificação de TGC se mostrou alterada no grupo OVX3 e OVX10. Em relação ao estresse oxidativo no tecido hepático, um aumento na peroxidação lipídica foi medido no grupo OVX10 em relação ao C. A atividade da CAT e da SOD foram aumentadas no grupo OVX10, enquanto que a atividade da GPx diminuiu nos grupos OVX3 e OVX10. Com relação ao tecido renal não encontramos alteração nos marcadores de estresse oxidativo, no entanto, a atividade da catalase encontra-se aumentada nos grupos OVX1 e OVX3 em relação ao grupo C. **CONCLUSÃO:** As doses supra-fisiológicas de ND levaram ao remodelamento do coração. O tratamento com ND na dosagem 10 mg/kg promoveu aumento dos TGC circulantes. No tecido hepático a dose de 10 mg/kg promoveu o aumento na peroxidação lipídica e na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. EAA nas dosagens de 3 e 10 mg/kg promoveram a diminuição na atividade da enzima GPx. Já no tecido renal, somente a atividade da enzima CAT foi alterada nos grupos OVX1 e OVX3. Portanto, o tratamento com a dose fisiológica de 0,1 mg/kg (OVX1) não afetou negativamente os parâmetros sistêmicos e nem o equilíbrio redox do tecido hepático e renal, indicando que o ND nesta dosagem pode ser uma alternativa promissora para realizar a Terapia Hormonal da Menopausa.

Palavras-chave: Ovariectomia, Decanoato de nandrolona e Estresse oxidativo.

ABSTRACT

JESUINO RAFAEL MACHADO FERREIRA

EFFECT OF TREATMENT WITH ANDROGENIC ANABOLIC STEROID ON THE REDOX PROFILE OF HEPATIC AND RENAL TISSUE IN OVARIECTOMIZED RATS

Orientador: Verônica Salerno Pinto

The absence of ovarian hormones can lead to various metabolic changes. Ovariectomy is the model used to study the changes caused by loss of ovarian function and reduction in estradiol secretion. Testosterone may be an alternative to hormone replacement because it is less hepatotoxic and the pharmacological modifications of this molecule reduce the side effects when used in low doses without altering the redox balance. **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of different doses of Androgenetic Anabolic Steroids (AAS, Nandrolone Decanoate) on the redox balance in the hepatic and renal tissues of ovariectomized rats. **METHODS:** Female Wistar rats (n = 33) were divided into five groups: control (C) and four groups of ovariectomized rats at 60 days of age treated for 8 weeks without (OVX) or with AAS every 15 days at 0.1 mg/kg (OVX1), 3 mg/kg (OVX3) and 10 mg/kg (OVX10). Homogenate of hepatic or renal tissue were used for biochemical dosages and plasma for tissue injury markers and TGC dosing. Data were analyzed by one-way ANOVA using GraphPad Prism software ($P \leq 0.05$ was considered significant). **RESULTS:** OVX groups presented a significant reduction in uterine weight in relation to C. The deposits of retroperitoneal fat showed an increase in the OVX and OVX1 groups in relation to C. We can verify a significant increase in the weight of the heart in the OVX10 group in relation to the C. No alterations were found in the biomarkers of CK, LDH, ALT, AST and GGT cell injury. However, CK-MB was altered in the OVX3 group, as well as, the quantification of TGC was altered in the OVX3 and OVX10 groups. In relation to oxidative stress in hepatic tissue, an increase in lipid peroxidation was measured in the OVX10 group in relation to C. The activity of CAT and SOD were increased in the OVX10 group, whereas the GPx activity decreased in the OVX3 and OVX10 groups. Regarding the renal tissue, we did not find alterations in the markers of oxidative stress, however, the catalase activity was increased in the OVX1 and OVX3 groups in relation to the C group. **CONCLUSION:** Supraphysiological doses of ND led to remodeling of the heart. Treatment with ND at the dose of 10 mg/kg promoted increase of the circulating TGC. In hepatic tissue the dose of 10 mg/kg promoted the increase in lipid peroxidation and in the activity of the antioxidant enzymes CAT and SOD. AAS at 3 and 10 mg/kg dosages promoted a decrease in GPx enzyme activity. In the renal tissue, only the CAT enzyme activity was altered in the OVX1 and OVX3 groups. Therefore, treatment at the physiological dose of 0.1 mg/kg (OVX1) didn't adversely affect the systemic parameters nor the redox balance of hepatic and renal tissue, indicating that ND at this dosage may be a promising alternative to perform the Therapy Hormonal of Menopause.

Key-words: Ovariectomy, Nandrolone decanoate and Oxidative stress.

Lista de abreviaturas

ALT – Alanina aminotransferase
AR – Receptor de Androgênio
AST– Aspartato aminotransferase
CAT – Catalase
CK – Creatina quinase
CK MB – Creatina quinase cardíaca
CPT1 – Carnitina palmitoil Transferase 1
EAA – Esteróide Anabolizantes Androgênicos
ER – Receptor de Estrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GGT – γ -Glutamil transferase
GPx – Glutaciona Peroxidase
HDL– Lipoproteínas de Alta Densidade
IL – Interleucina
LDH – Lactato desidrogenase
LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade
LH – Hormônio Luteinizante
ND – Decanoato de Nandrolona
OVX – Ovariectomia
SOD – Superóxido dismutase
T – Testosterona
TGC– Triglicerídeos
THM – Terapia Hormonal da Menopausa
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Lista de abreviaturas	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Menopausa	1
1.2 Ovariectomia.....	3
1.3 Esteroides Anabolizantes Androgênicos.....	4
1.4 Uso dos Esteroides Anabolizantes Androgênicos	5
1.5 Efeitos do uso dos Esteroides Anabolizantes Androgênicos	6
1.6 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	9
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODO	13
4.4 Análises Biométricas	15
4.5 Análises Bioquímicas	15
4.6 Biomarcadores de lesão celular	15
4.7 Análise dos biomarcadores de estresse oxidativo	19
4.8 Análise da atividade das enzimas antioxidantes	20
4.9 Avaliação do perfil lipídico	21
5. Análise Estatística	22

6. RESULTADOS	22
6.1 Análises Biométricas	22
6.2. Biomarcadores de Lesão Celular e Perfil Lipídico	24
6.3.Biomarcadores de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes	26
6.3.1. Tecido Hepático	26
6.3.2. Tecido Renal	28
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. Introdução

1.1.Menopausa

Os principais estrógenos que ocorrem naturalmente nas mulheres são o estradiol, a estrona e o estriol. O estradiol é produzido principalmente durante os anos reprodutivos podendo alcançar picos de cerca de aproximadamente 31 ng/100 ml de plasma durante o período fértil (Baird e Guevara, 1969). Os estrógenos agem sobre os receptores ER α e ER β que regulam diversas vias transcricionais em resposta aos níveis de hormônios circulantes, com isso a atividade intracelular desses receptores varia durante o ciclo estral, reprodutivo e pós menopausa levando a regulação do metabolismo energético (Villa *et al.*, 2012). Esses hormônios desempenham um papel importante na regulação metabólica, do peso corporal e do apetite (Della Torre *et al.*, 2014; Hirschberg, 2012; Hong *et al.*, 2009; Kaaja, 2008; You *et al.*, 2004), também já foi demonstrado que esses hormônios regulam positivamente a longevidade em seres humanos e animais (Asdell *et al.*, 1967; Benedusi *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2009).

O climatério é a fase de vida das mulheres onde ocorre a transição do período reprodutivo para o não-reprodutivo (Fernandes *et al.*, 2004). O Ministério da Saúde estabelece o período entre 40-65 anos de idade como limite para sua ocorrência (Mota *et al.*, 2008). Esse período pode ser dividido em duas fases: perimenopausa ou pré-menopausa, que se inicia dois anos antes da última menstruação e vai até um ano após, caracterizado com ciclos menstruais irregulares e alterações endócrinas e pós-menopausa, que começa um ano após a última menstruação (Harlow *et al.*, 2012). Durante a menopausa há perda da função ovariana, que consiste basicamente na diminuição dos folículos ovarianos e redução progressiva da secreção de estradiol (cerca de 1,3 ng/100 ml de plasma) que vai sendo substituído pela estrona, que predomina na pós-menopausa (Baird e Guevara, 1969; Bossemeyer, 1999; Aldrighi *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2008). Isso ocorre como uma tentativa de manter a foliculogênese, levando ao aumento das gonadotrofinas Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) que atuam sobre o estroma dos ovários e glândulas supra-renais, aumentando a produção de androgênios (testosterona e androstenediona) que serão convertidos periféricamente em estrona a partir da enzima aromatase presente nos tecidos adiposo, muscular e renal (Metcalf e Livesey, 1985; Mota *et al.*, 2008).

Com a redução nos níveis de estradiol ocorre a diminuição da quantidade de massa magra e aumento no tecido adiposo (Poehlman e Tchernof, 1998; Tchernof *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2000 e Poehlman, 2002). Além disso, essa redução pode contribuir para o aumento de uma série de distúrbios metabólicos (You *et al.*, 2004; Kaaja, 2008; Della Torre *et al.*, 2014), como diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Carr, 2003; Bulun, 2011). Obesidade, resistência a insulina e dislipidemia são características comuns da síndrome metabólica que pode ocorrer em até 60% das mulheres na pós menopausa (Park *et al.*, 2011), contribuindo para o aumento da ocorrência de doenças cardiovasculares (Sites *et al.*, 2002; Weidemann e Hanke, 2002; Rosano *et al.*, 2007; Gaspard, 2009). Além disso, já se sabe que o estrogênio modula a atividade das citocinas através de alterações na função das células imunes, na ação dos antioxidantes e na atividade do óxido nítrico (Pacifici *et al.*, 1991; Bismar *et al.*, 1995; Pfeilschifter *et al.*, 2002; Sites *et al.*, 2002 e Benedusi *et al.*, 2014) levando a mudanças na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias que pode desencadear o desenvolvimento de osteoporose, Alzheimer, artrite e outras doenças inflamatórias após a menopausa (Pacifici *et al.*, 1991; Paganini-Hill e Henderson, 1994; Pacifici, 1996; Wluka e Cicuttini, 2000; Polotsky *et al.*, 2010; Bhalla, 2010).

Cerca de 60 a 80% das mulheres relatam algum tipo de sintoma relacionado ao período da menopausa (Speroff *et al.*, 1989). Entre eles são comuns queixas relacionadas a sintomas vasomotores, ressecamento vaginal, dispareunia e urgência miccional, decorrentes de atrofia urogenital (Speroff *et al.*, 1989; Bossemeyer, 1999; Aldrighi *et al.*, 2002; De Lorenzi *et al.*, 2005). De Lorenzi *et al.* (2005) mostraram que os sintomas relacionados a menopausa também sofrem influência de fatores psicossociais. Estes sintomas têm importante repercussão no âmbito sexual e na qualidade de vida das mulheres (Speroff *et al.*, 1989; Bossemeyer, 1999; Aldrighi *et al.*, 2002).

Com o objetivo de amenizar ou mesmo reduzir os sintomas causados no período da menopausa milhões de mulheres são tratadas com Terapia Hormonal da Menopausa (THM) que consiste na reposição estrogênica isolada ou associada a reposição progesterônica (Oppermann-Lisbôa e Wannmacher, 2001; Pardini, 2007).

Os efeitos benéficos ou não dessa terapia ainda são controversos. Estudos demonstraram que a THM usando estrogênio (0,625 mg/dia/4 semanas) em mulheres submetidas a cirurgia de ovariectomia bilateral levou à diminuição dos níveis de

Interleucina 1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) após tratamento, atingindo níveis pré-operatórios no final da quarta semana de tratamento com estrogênio, diferente do grupo controle no qual o aumento dessas citocinas foi observado até a oitava semana pós cirurgia (Pacifici *et al.*, 1991). No entanto, estudos mais recentes realizados pela “Women’s Health Initiative” acompanhou mais de dezesseis mil mulheres tratadas com estrogênio (0,625 mg/dia) conjugado a progesterona (2,5 mg/dia) ou placebo, inicialmente o estudo deveria durar cerca de 8,5 anos, após 5,2 anos de acompanhamento a equipe de monitoramento recomendou interromper o teste com estrogênio mais progesterona vs placebo pois o risco de desenvolver câncer de mama invasivo, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar e doença coronariana excedeu o limite, mostrando que essa terapia oferece mais riscos que benefícios (Rossouw *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram que a THM usando estrogênio também chegaram a resultados semelhantes (Grodstein *et al.*, 1996; Hulley *et al.*, 1998; Josefson, 2003; Shumaker *et al.*, 2003; Lobo, 2004).

1.2.Ovariectomia

Ratas ovariectomizadas (OVX) são usadas como modelo experimental para simular o período da menopausa e investigar os efeitos farmacológicos decorrentes da THM durante e após esse período (Abbas e Elsamanoudy, 2011; Kaume *et al.*, 2012; Ryou *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015). Após a retirada dos ovários o ciclo estral das ratas é desregulado e os níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona diminuem (Kaeoke *et al.*, 2001). Sabe-se que os hormônios ovarianos desempenham papel importante na saúde e a ovariectomia pode reduzir o tempo de vida de camundongos (Asdell *et al.*, 1967; Shoupe *et al.*, 2007; Benedusi *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Como resultado da redução hormonal as ratas tendem a um maior ganho de massa, especialmente no tecido adiposo visceral (Maltais *et al.*, 2009; Carosio *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012), levando a remodelação desse tecido, hipertrofia de adipócitos (Ludgero-Correia *et al.*, 2012), inflamação do tecido adiposo e esteatose hepática (Rogers *et al.*, 2009), isso aumenta a suscetibilidade para se tornarem obesas (Hong *et al.*, 2009).

Diversas enzimas estão envolvidas no metabolismo lipídico em mulheres na pré e pós-menopausa, entre elas a acetil-CoA carboxilase α , a acil-CoA desidrogenase de cadeia

longa e a lipase sensível a hormônios encontram-se alteradas na gordura abdominal de mulheres na pós-menopausa (Misso *et al.*, 2005). Essas alterações levam ao aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes e da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pela via da β -oxidação (Lin *et al.*, 2005), que aumenta o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo resultando no aumento na secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- α e Interleucina-6 (IL-6) (Weisberg *et al.*, 2003, Xu, *et al.*, 2003, Fantuzzi, 2005, Ahima, 2006, Suganami *et al.*, 2007). Isso resulta no desbalanço do estado inflamatório basal de diversos órgãos metabólicos, por exemplo tecido adiposo e fígado (Benedusi *et al.*, 2014). Além disso, já foi relatado que a ativação de ER no fígado tem um importante papel na manutenção do metabolismo de gorduras e ratas ovariectomizadas apresentam aumento de ácidos graxos nesse órgão como resultado da mudança na expressão de diferentes mRNA que regulam essas vias (Villa *et al.*, 2012).

Tendo em vista que o tratamento hormonal utilizando estrôgenio e/ou progesterona apresentam efeitos colaterais deletérios, a busca por novas estratégias terapêuticas que reduzam os riscos associados a menopausa e a terapia hormonal convencional apresentam um grande apelo na atualidade, visto que a população está vivendo mais. Uma alternativa a reposição dos hormônios femininos poderia ser através dos Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAA).

1.3.Esteroides Anabolizantes Androgênicos

A testosterona foi isolada e caracterizada na Alemanha na década de 30 (David *et al.*, 1935; Wettstein, 1935; Kuhn, 2002), a partir disso vários derivados foram sintetizados e chamados de Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAA) (Kopera, 1985). Esses derivados foram estudados e sintetizados para tentar prolongar a meia-vida metabólica da molécula original e melhorar sua eficiência (Kuhn, 2002).

Os hormônios esteroides androgênicos são produzidos pelo córtex da supra-renal e pelas células de Leydig dos testículos ou em pequena quantidade pelo estroma ovariano (Silva *et al.*, 2002). Esses hormônios são sintetizados a partir do colesterol (Pope *et al.*, 2010), que, a partir de sucessivas oxidações forma a pregnenolona, que é o principal precursor dos hormônios esteroides (Handelsman, 2001). Eles são moléculas lipofílicas que

apresentam grande facilidade em atravessar as membranas plasmáticas das células e exercem seus efeitos se ligando aos Receptores de Andrógenos (AR) intracelulares estabilizados pelas proteínas de choque térmico, as HSP90 (Litwack e Schmidt, 1997; Silva *et al.*, 2002; Bahrke e Yesalis, 2004). Depois de formado o complexo hormônio-receptor, as HSP90 se desligam e o complexo se move para o núcleo onde se liga ao DNA permitindo a transcrição ou repressão dos genes, estimulando a produção de mRNA que leva ao aumento da síntese proteica (Wilson, 1996; Litwack e Schmidt, 1997; Bahrke e Yesalis, 2004).

Os EAA pertencem a classe dos hormônios sexuais masculinos, promotores das características sexuais secundárias associadas à masculinidade e das características anabólicas dos tecidos somáticos (Handelsman, 2001), como por exemplo estimular a fixação de nitrogênio e aumentar a síntese e uso de proteínas pelas células musculares esqueléticas (Kuhn, 2002). Alguns autores se referem aos esteroides anabolizantes como os derivados sintéticos da testosterona (Hoberman e Yesalis, 1995; Goldberg *et al.*, 2000) que possuem atividade anabólica (crescimento) superior à atividade androgênica (masculinização) (Su *et al.*, 1993; Shahidi, 2001).

A testosterona e seus derivados são metabolizados no fígado (Rang *et al.*, 1997; Hall e Hall, 2005). Visando excluir ou reduzir os efeitos colaterais que podem ser causados nesse órgão, aumentando as propriedades anabólicas e diminuir os efeitos androgênicos, a indústria farmacêutica realizou modificações na estrutura molecular desses compostos, dando origem a três classes: A – ésteres dos grupos 17- β -hidroxil, B – compostos alquilados na posição 17- α -hidroxil e C – compostos que tiveram o anel esteroide A, B ou C alquilado (Thein *et al.*, 1995; Evans, 2004; Hall e Hall, 2005). A alquilação e a alteração do anel são usados nas preparações via oral, portanto são relativamente resistentes a degradação hepática, por exemplo: metandrostebolona, oximetolona, metiltestosterona e estanozolol (Lukas, 1993; Evans, 2004; Hall e Hall, 2005). A esterificação é usada nas preparações parenterais, por exemplo: propionato de testosterona e nandrolona (Thein *et al.*, 1995; Melo, 1997; Hall e Hall, 2005). A estereificação diminui a polaridade da molécula tornando-a mais solúvel em lipídeos para preparações injetáveis de liberação lenta, levando a menor toxicidade hepática e prolongando sua ação (Lukas, 1993; Evans, 2004; Hall e Hall, 2005).

1.4. Uso dos EAA

Tratamentos com doses fisiológicas de EAA tem sido usado desde o início da década de 50 (Dirix *et al.*, 1988). Essa terapia androgênica pode ser usada para o tratamento de diversas doenças, entre elas estão a anemia causada por falhas na medula óssea e rins (de Rose e Nóbrega, 1999; Conway *et al.*, 2000; Sanchez-Medal *et al.*, 1969; Evans, 2004), trombocitopenia, angioedema hereditário, câncer de mama (Ebeling e Koivisto, 1994; Sanchez-Medal *et al.*, 1969; Evans, 2004), obesidade (Corrigan, 1999), osteoporose, para reduzir a fragilidade sarcopênica relacionada à idade e para melhorar o humor e a depressão (Sanchez-Medal *et al.*, 1969; Evans, 2004). Desde o final da década de 40 e início da década de 50 até os dias atuais, seu uso também se popularizou entre os atletas que começaram a experimentar preparados formulados com a testosterona (Hoberman e Yesalis, 1995), visando aumentar o desempenho nas competições (Goldwire e Price, 1995) e aumento de massa muscular sem se preocupar com os efeitos negativos (Yesalis *et al.*, 1993; Bahrke e Yesalis, 2004; Hartgens e Kuipers, 2004; Rashid *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 2008; Sjoqvist *et al.*, 2008).

1.5. Efeitos do uso dos EAAs

O uso de doses supra-fisiológicas EAA está associado ao aparecimento de diversos problemas de saúde (See, See e Gluud, 1992; Stimac *et al.*, 2002). Ele está associado ao estresse oxidativo das células hepáticas devido a ativação de AR que leva ao aumento na produção de EROs. Após a ativação de AR ocorre o aumento da expressão da proteína ligante de ácidos graxos (CD36) na membrana plasmática das células (Pinthus *et al.*, 2007) e a expressão de Carnitina Palmitoiltransferase 1 (CPT1) na membrana mitocondrial que aumenta a captação de ácidos graxos, levando ao aumento da oxidação e geração de EROs (Lin *et al.*, 2010). Este aumento de EROs também pode ser observado após tratamento com EAA 17 α -alquilado induzido pelo aumento na β -oxidação (Guzmán *et al.*, 1991, Pinthus *et al.*, 2007b, Lin *et al.*, 2010). O aumento do estresse oxidativo, induz a degeneração e remodelamento da membrana interna da mitocôndria (Gragera *et al.*, 1993, Mannella, 2008). Uma estratégia utilizada para redução das lesões por EROS é o uso de antioxidantes,

os quais exibem um efeito protetor contra a hepatotoxicidade induzida por EAAs (Bond *et al.*, 2016).

As lesões teciduais variam de acordo com a classe de EAA utilizada, sendo que, os alquilados (classe B e C) são mais hepatotóxicos (Marquardt *et al.*, 1964; Gordan *et al.*, 1965; Chesnut *et al.*, 1983; Friedl, 2000; Snyder, 2001; Hengge *et al.*, 2002), enquanto que os esterificados (classe A), mesmo em doses suprafsiológicas (Bhasin *et al.*, 2001), não apresentam hepatotoxicidade (Marquardt *et al.*, 1964; Kuipers *et al.*, 1991). Já foi relatado que as lesões hepáticas são reversíveis, pelo menos em parte, quando o uso é descontinuado (O'Connor *et al.*, 1990; Stimac *et al.*, 2002; Urhausen *et al.*, 2003). Também foi relatado que o uso de doses suprafsiológicas de EAAs leva a proliferação de canais biliares (Turani *et al.*, 1983), peliose hepática, adenoma hepático (Turani *et al.*, 1983; Sale *et al.*, 1977) e hepatocarcinoma (Velazquez e Alter, 2004).

O uso de EAAs também pode afetar negativamente o perfil lipídico sérico levando a alterações nos níveis das proteínas que transportam o colesterol no sangue, como, por exemplo, a diminuição de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e aumento de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) (McKillop e Ballantyne, 1987; Lenders *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1989; Zuliani *et al.*, 1989; Baldo-Enzi *et al.*, 1990; Glazer, 1991; Melchert e Welder, 1995; Bagatell e Bremner, 1996; Kouri *et al.*, 1996; Lajarin *et al.*, 1996; Palatini *et al.*, 1996; Sader *et al.*, 2001; Hartgens *et al.*, 2004), aumentando o risco de doença cardiovascular (DCV), hipertensão, ataque cardíaco, doença coronariana e acidente vascular cerebral (Frankle *et al.*, 1988; Ferenchick, 1990; Glazer, 1991; Ferenchick e Adelman, 1992; Melchert e Welder, 1995; Sader *et al.*, 2001; Karila *et al.*, 2003; Grundy *et al.*, 2004). Os hormônios esteroides alteram os níveis de lipoproteínas séricas (LDL e HDL) através da degradação, remoção de receptores de estrogênio, modificação na síntese de apolipoproteína AI e B e aumento da atividade da lipase hepática (Baldo-Enzi *et al.*, 1990; Glazer, 1991). Esse quadro está mais associado ao uso de EAAs alquilados orais (Thompson *et al.*, 1989). Os níveis de colesterol podem retornar ou não ao normal com a interrupção do uso de esteroides e a normalização depende da duração de uso de EAAs (Cohen *et al.*, 1988; Lenders *et al.*, 1988; Glazer, 1991; Shahidi, 2001; Urhausen *et al.*, 2003; Hartgens *et al.*, 2004; Lane *et al.*, 2006).

Os EAAs se ligam a receptores de andrógenos no coração (Bergink, Geelen e Turpijn, 2005). Níveis fisiológicos de esteroides parecem ter um efeito benéfico nas artérias através da liberação endotelial de óxido nítrico (Wynne e Khalil, 2003; Rosano, Cornoldi e Fini, 2005), quando em excesso os efeitos benéficos são perdidos, além de levar a hipertrofia cardíaca e apoptose (Ferrer *et al.*, 1994; Kai *et al.*, 1998; Zaugg *et al.*, 2001). Além disso, a expressão aumentada de marcadores apoptóticos como HSP70 e de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α foram encontrados em usuários de altas dosagens de EAAs (Fineschi *et al.*, 2011).

Poucos estudos com modelos animais foram realizados visando avaliar o impacto das doses supra-fisiológicas dos EAA nos rins, e estudos em humanos ainda não estabeleceram claramente uma relação direta de causa e efeito entre o abuso de EAA e a lesão renal (Zeier *et al.*, 1998, Ahmed Bin Bisher, 2009 e Hoseini *et al.*, 2009). As primeiras associações entre lesão renal e o uso de doses supra-fisiológicas de EAAs são da década de 60. Bekemeier e Pohle (1968), evidenciaram que o uso desses fármacos apresenta um potencial efeito indutor de depósito renal de cálcio. A partir daí diversos estudos mostraram que o uso abusivo desses fármacos pode causar várias lesões renais. Prat *et al.* (1977) relataram um caso de Tumor de Wilms em um adulto que fazia uso abusivo do EAA metandrostenolona (Dianabol) por alguns anos. Hageloch *et al.* (1988) descreveram um caso de rabdomiólise com injúria renal aguda após uso de diversos EAA (inclusive ND) em um praticante de musculação. Yoshida *et al.* (1994), mostraram a presença de necrose tubular aguda em um homem de 26 anos com grave colestase após o uso de 125 mg de estanozolol duas vezes por semana por 1 mês.

O Decanoato de Nandrolona (ND) tem sido um dos EAA mais utilizados (Clark, 2003; Perry *et al.*, 2005; Parkinson e Evans, 2006; Silva *et al.*, 2007; Buttner e Thieme, 2010). Este esteroide foi sintetizado em 1950 (Birch, 1950), possui metabolismo semelhante ao da testosterona (Engel *et al.*, 1958) e pode ser aromatizado (Gaillard e Silberzahn, 1987). No entanto, é mais anabólico que a testosterona (Shahidi, 2001). Pode apresentar como efeitos secundários ao uso de doses supra-fisiológicas o aumento na pressão sanguínea (Tseng *et al.*, 1994; Bissoli *et al.*, 2009; Franquni *et al.*, 2013; Hassan e Kamal, 2013), diversas anomalias cardíacas como: hipertrofia e deposição de colágeno na matriz extracelular (Andrade *et al.*, 2008; Bissoli *et al.*, 2009; Tanno *et al.*, 2011) e

desequilíbrio nas citocinas inflamatórias (Franquni *et al.*, 2013; Riezzo *et al.*, 2014). Contudo, há relatos, que o uso em doses fisiológicas apresenta efeitos benéficos. Pacientes com insuficiência renal crônica, tratados por seis meses, apresentaram aumento significativo de massa muscular quando comparado ao grupo controle que recebeu somente placebo (Johansen *et al.*, 1999), assim como homens HIV positivo tratados por dezesseis semanas (Gold *et al.*, 1996).

Já foi mostrado que o uso de ND na Terapia Hormonal da Menopausa (THM) em ratas ovariectomizadas tem um resultado positivo. Urtado *et al.* (2011) mostraram que a administração de ND associado ao treinamento de resistência melhora a sensibilidade a insulina em ratas ovariectomizadas. No entanto, ainda não há um consenso na literatura sobre a dose ideal de EAA para a THM, já que a utilização em excesso pode causar alterações no balanço redox de diversos tecidos, aumentando a produção de EROs e diminuindo a atividade antioxidante, podendo levar a lesão do DNA (Frankenfeld *et al.*, 2014 e Pozzi *et al.*, 2013).

1.6. Estresse Oxidativo e enzimas antioxidantes

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidante a favor do primeiro (Sies *et al.*, 1985). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são as moléculas mais envolvidas nesse processo. Incluem, por exemplo, radicais livres que são átomos, moléculas ou íons com a presença de um elétron desemparelhado em seu último orbital atômico ou molecular como, por exemplo, o ânion superóxido [$O_2^{\bullet-}$] e moléculas que embora reativas, não apresentam um elétron desemparelhado, por exemplo a molécula de peróxido de hidrogênio [H_2O_2] (Halliwell, 2006; Brieger *et al.*, 2012, Gutowski e Kowalczyk, 2013).

Essas moléculas são altamente reativas, ou seja, são capazes de "roubar" elétrons de outras moléculas para atingir sua estabilidade e prejudicam as moléculas que compõe a estrutura celular como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Reuter *et al.*, 2010). Apesar das EROs estarem envolvidas com diversas patologias elas também desempenham um papel importante em diversos processos fisiológicos vitais, de forma que tentar minimizá-los, em determinadas situações, pode trazer resultados prejudiciais (Finaud *et al.*, 2006; Brieger *et al.*, 2012).

As EROs intracelulares podem originar-se de várias reações celulares catalisadas por enzimas, a principal via dessa formação ocorre através da respiração celular mitocondrial. O superóxido, por exemplo é produzido a partir da liberação de elétrons da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (Balaban, Nemoto e Finkel, 2012). Para se contrapor aos efeitos deletérios dos agentes oxidantes, nosso organismo conta com um eficiente sistema de defesa antioxidante, dividido em enzimático (endógeno) e não-enzimático (majoritariamente exógeno, originário da dieta), capazes de reduzir a severidade do estresse oxidativo, formando menos radicais reativos e/ou minimizar a cadeia de reações que leva ao dano oxidativo (Dekkers et al., 1996). A superóxido dismutase, por exemplo, converte superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Após essa conversão, a catalase converte peróxido de hidrogênio em água no citoplasma, enquanto as glutatona peroxidases são responsáveis por essa conversão nas mitocôndrias. A conversão de peróxido de hidrogênio em água é importante, uma vez que essa molécula é o precursor do radical hidroxilo que é altamente reativo [\bullet OH] (Halliwell, 2006; Marí *et al.*, 2009; Morón e Castilha-Córtazar, 2012). Conforme mencionado anteriormente, quando a concentração de radicais livres e EROs ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, pode ocorrer morte celular, com um conseqüente extravasamento de proteínas e enzimas, que são, por sua vez, exclusivamente intracelulares (Ramos *et al.*, 2013) (Figura 1).

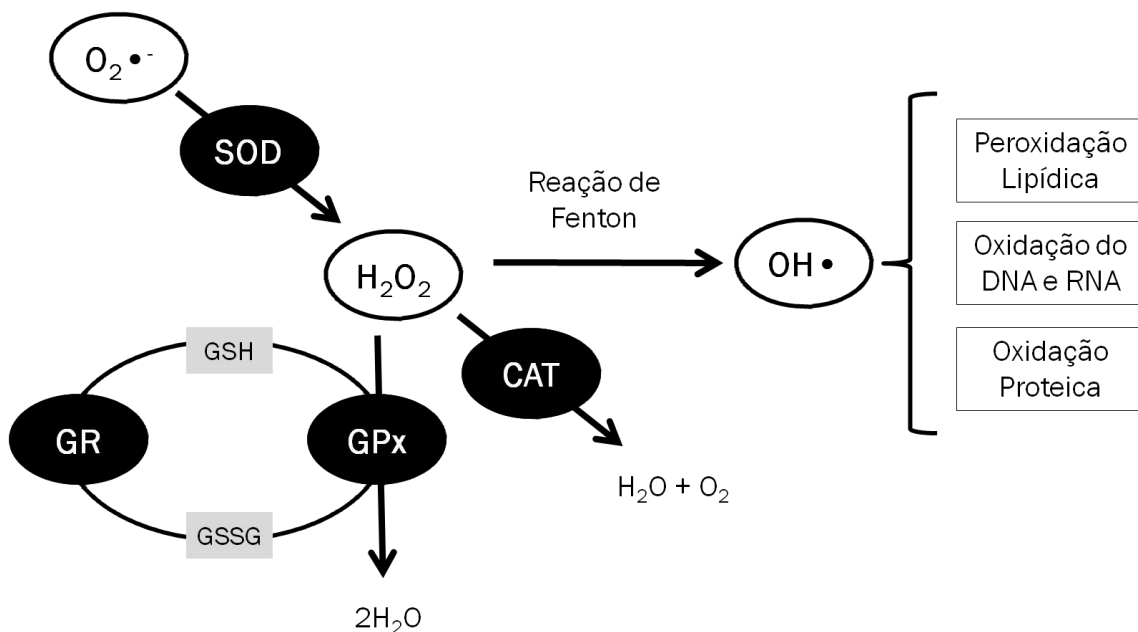


Figura 1. Mecanismo de defesa antioxidante. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GPx: glutatona peroxidase, GR: glutatona redutase, GSH: glutatona reduzida, GSSG: glutatona oxidada. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2007.

As EROs surgem principalmente como subprodutos dos processos metabólicos. Portanto, várias patologias hepáticas estão envolvidas com estresse oxidativo como, por exemplo, hepatotoxicidade induzida por álcool (Sid, Verrax e Calderon, 2013), por metais (Britton, 1996) e por EAAs (Cerretani *et al.*, 2013). A hepatotoxicidade induzida por EAAs já foi demonstrada como associada ao estresse oxidativo das células hepáticas (Welder, Robertson e Melchert, 1995; Pey *et al.*, 2003; El-Moghazy, Tousson e Sakeran, 2012; Frankenfeld *et al.*, 2014). A ativação de AR leva ao aumento de EROs mediado pelo aumento da enzima carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1). Essa enzima é importante no processo de β -oxidação mitocondrial (Pinthus *et al.*, 2007; McGarry e Brown, 1997). Pinthus *et al.* (2007) demonstraram um aumento basal de EROs após uso de EAAs alquilados e que esse aumento é induzido pelos EAAs na β -oxidação (Lin *et al.*, 2010). Além disso, em associação ao aumento de EROS foi encontrado níveis aumentados de mRNA de CPT1, alterações ultraestruturais e sinais de degeneração mitocondrial nos hepatócitos com remodelação de suas membranas internas em ratos tratados com esteroide alquilado, evidenciando que estas alterações podem ser causadas pelo estresse oxidativo (Guzmán *et al.*, 1991; Gragera *et al.*, 1993; Mannella, 2008; Zhang *et al.*, 2013) (Figura 2). O uso de antioxidantes mostrou ser eficiente contra a hepatotoxicidade induzida por EAAs. Atletas que usaram EAAs em associação com um complexo multivitamínico e fosfolípídeo

(composto N) obtiveram resultados positivos nos marcadores de dano hepático quando comparados com atletas que não usaram o composto (Pagonis *et al.*, 2008).

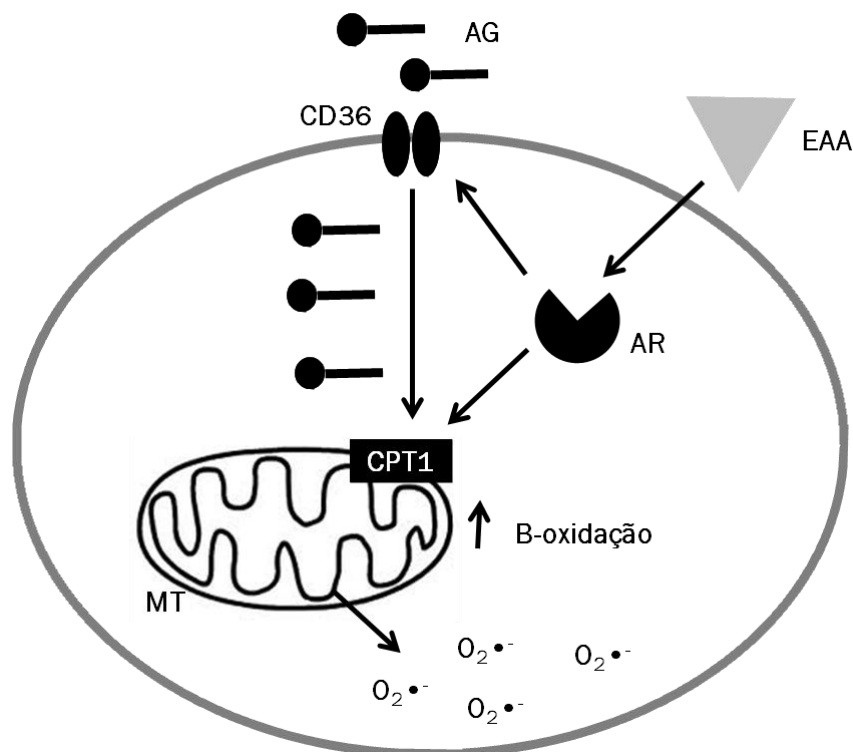


Figura 2. Mecanismo de lesão tecidual induzida por EAA. AG: ácido graxo, EAA: esteroide anabolizante androgênico, AR: receptor de andrógeno, CPT1: carnitina palmitoil transferase 1, MT: mitocôndria. Adaptado de Lin *et al.*, 2010.

Pouco se sabe sobre os efeitos que uma THM utilizando EAA pode causar em ratas ovariectomizadas e sabe-se menos ainda quais efeitos essa terapia pode causar sobre o balanço redox. Portanto, novos estudos mostrando esses resultados são necessários.

2. Justificativa

A literatura ainda diverge sobre o uso terapêutico de Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAA), além disso, há poucos trabalhos que relacionam o uso específico de Decanoato de nandrolona (ND) como fármaco que poderia ser usado na Terapia Hormonal da Menopausa (THM) e pouco se sabe acerca de seus efeitos benéficos ou não. Levando em consideração que muitas mulheres não podem realizar a THM com estrogênio e/ou progesterona pois apresentam maior risco de desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo câncer de mama invasivo, a busca por uma nova estratégia terapêutica é de fundamental importância. Portanto, a avaliação de outros fármacos como o ND como

alternativa para reposição hormonal é de grande importância. Além de inédito, este estudo pode trazer importantes informações que poderão ter aplicabilidade futura, indicando quais dosagens são seguras no controle da sintomatologia gerada no período da menopausa, bem como, na diminuição dos efeitos causados pela redução hormonal pós menopausa.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Determinar a resposta oxidativa e antioxidante no tecido hepático e renal em ratas ovariectomizadas após o tratamento com Decanoato de nandrolona (ND) por 8 semanas com diferentes doses.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar se há variação no peso corporal em resposta a ovariectomia e ao tratamento com ND.
- Avaliar o comportamento dos biomarcadores de lesão celular no plasma em resposta a ovariectomia e ao tratamento com diferentes doses de ND.
- Verificar se a ovariectomia altera o perfil lipídico das ratas na ausência e presença do tratamento com as diferentes dosagens de ND.
- Caracterizar o efeito da ovariectomia e do tratamento com diferentes dosagens de ND sobre biomarcadores de lesão celular e resposta antioxidante no tecido hepático.
- Caracterizar o efeito da ovariectomia e do tratamento com diferentes dosagens de ND sobre os biomarcadores de lesão celular e resposta antioxidante no tecido renal.
- Determinar qual a dosagem de ND gera menor efeito deletério no perfil redox e lipídico.

4. Material e Método

4.1. Animais

Um total de 33 ratas Wistar, com idades em torno de 60 dias foram utilizadas. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (23 °C) e luminosidade (12 horas de luz/ 12 de escuro) com livre acesso a água e ração padrão fornecida para animais de laboratório pela BIOBASE – ALIMENTOS PARA ANIMAIS SC/ BRASIL.

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) em Experimentação Científica do CCS-UFRJ sob o número 064/16.

4.2.Ovariectomia

Ovariectomia bilateral foi realizada em ratas fêmeas anestesiadas com cetamina (0,5 mL/kg) e xilazina (0,125 mL/kg) através de injeção intraperitoneal (ip). As ratas foram submetidas a uma incisão muscular para abrir a cavidade peritoneal, em seguida os túbulos uterinos foram expostos e os ovários removidos. Em seguida, a cavidade peritoneal foi suturada e limpa (Ben *et al.*, 2009 e Mackedanz *et al.*, 2011). Os animais do grupo controle foram submetidos a uma cirurgia simulada com a incisão e exposição dos túbulos uterinos sem a remoção dos ovários. Em seguida, os animais foram deixados em recuperação por 15 dias.

4.3. Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em 5 grupos: Controle (C), Ovariectomizado controle (OVX), Ovariectomizado + Tratamento com de Decanoato de Nandrolona, dose 0,1 mg/kg (OVX1), Ovariectomizado + Tratamento com de Decanoato de Nandrolona, dose 3 mg/kg (OVX3) e Ovariectomizado + Tratamento com de Decanoato de Nandrolona, dose 10 mg/kg (OVX10).

4.4.Tratamento com Decanoato de Nandrolona

O tratamento foi iniciado após o período de recuperação da cirurgia de ovariectomia ou cirurgia simulada (controle) durante oito semanas, a cada 15 dias, através de injeção via intramuscular de Decanoato de Nandrolona (ND) em diferentes concentrações (0,1 mg/kg; 3 mg/kg e 10 mg/kg) dissolvido em óleo de amendoim. Nos grupos controle foram aplicados somente o veículo (óleo de amendoim, com 10% de álcool benzílico).

4.5. Coleta de secreção vaginal

A secreção vaginal foi obtida diariamente durante duas semanas consecutivas. Ela foi coletada com uma pipeta de plástico preenchida com 10 μ L de solução salina (NaCl 0,9%), inserindo a ponta na vagina da rata. O fluido vaginal foi colocado em lâminas de vidro. Uma lâmina de vidro diferente foi usada para cada animal. O material não corado foi observado sob um microscópio de luz com auxílio de objetiva de 40x. Três tipos de células poderiam ser reconhecidas: as redondas e nucleadas são células epiteliais; os irregulares sem núcleo são as células cornificadas; e as pequenas e redondas são os leucócitos. A proporção entre eles foi usada para a determinação das fases do ciclo estral. Com base na proporção de células encontradas, as fases do ciclo estral foram caracterizadas da seguinte forma: (1) proestro, predominância de células epiteliais nucleadas e (2) diestro, a mesma proporção de leucócitos e células epiteliais nucleadas, queratinizadas (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

4.6. Eutanásia

A eutanásia foi realizada oito semanas após o início do tratamento com ND. Os animais foram mantidos em jejum de doze horas antes da eutanásia para coleta de sangue para as análises bioquímicas. Os animais foram pesados e posteriormente decapitados. O sangue foi recolhido em tubos de ensaio com anticoagulante. Amostras de 10mL foram obtidas e imediatamente colocadas em gelo. As amostras foram centrifugadas (1500 x g, 4 °C/15 minutos) para separação do soro. O soro foi separado em alíquotas de 1 mL e estocados a -80 °C para posterior análise.

Durante a eutanásia também foi realizada a contagem do número de linfócitos totais em linfonodo periférico. Os linfonodos foram dissecados e macerados em solução PBS (concentração final de NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM e pH de 7.4), 50 μ L de PBS + células foram colocadas em câmara de Neubauer e contados em microscópio de luz. O número total de células foi dividido pelo número de quadrantes contados e multiplicados pelo fator de diluição.

4.7. Análises Biométricas

Foram avaliados os seguintes parâmetros

1– *Peso corpóreo*: O ganho de peso dos animais foi determinado antes da cirurgia de ovariectomia e no dia em que os animais foram sacrificados utilizando balança digital Filizola™.

2– *Peso dos depósitos de gordura*: As gorduras visceral e retroperitoneal foram isolados e pesados usando balança digital semi analítica Digimed KN 500 após o sacrifício em todos os grupos.

3 – *Peso dos órgãos*: após o sacrifício o coração, a adrenal, o baço e timo foram isolados e pesados usando balança digital semi analítica Digimed KN 500.

4 – *Peso do útero*: O útero foi pesado usando balança digital semi analítica Digimed KN 500 como forma de demonstrar a eficiência da cirurgia de ovariectomia e da THM.

4.8. Preparo de homogenato tecidual

Durante a eutanásia o fígado foi retirado e aliquotas foram estocados a -80 °C para posterior análise. Antes dos experimentos foi preparado um homogenato de tecido hepático ou renal total. Para isso, 100 µg de tecido hepático ou renal foram homogeneizados em 900 µL de tampão antioxidante (Tris HCl 10mM, pH=8,0, volume= 7500 µL; salina 0,9%, volume=135 µL; aprotinina 0,5 mg/mL, volume= 0,5 µL; PMSF 1 mM, volume 150 µL; água MilliQ, volume= 7,35 mL) usando Ultra-Turrax® IKA® T10 basic matendo a amostra em gelo. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 700 x g por 15 minutos, coletou-se o sobrenadante que foi congelado a -80 °C.

4.9. Análises Bioquímicas

As análises dos parâmetros bioquímicos foram realizados de acordo com as técnicas tradicionalmente utilizadas em laboratórios clínicos e realizadas em duplicata, seguindo as melhores práticas em análises clínicas.

4.9.1. Biomarcadores de Lesão Celular

4.9.1.1. Creatina Quinase

A análise de creatina quinase (CK) foi obtida por meio de teste cinético, através da velocidade de redução do NADP^+ a NADPH que é proporcional a atividade de CK na amostra. Para tal foi utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. Em um cubeta termostaticada a 37 °C foi adicionado 20 μL de plasma e 1,0 mL do reagente de trabalho. O reagente de trabalho é a mistura de 4 partes do reagente nº 1 (Tampão - Acetato de Imidazol (pH 6,7) 100 mmol/L, Glicose 20 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, NADP 2 mmol/L, Hexoquinase 3500 U/L, Acetato de Magnésio 10 mmol/L e N-acetilcisteína 20 mmol/L, conservado entre 2 e 8°C) com 1 parte do reagente nº 2 (Enzima - Substrato - Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase 2000 U/L, Creatina Fosfato 30 mmol/L, ADP 2 mmol/L, AMP 5 mmol/L e Diadenosina Pentafofato 10 mmol/L). A absorvância foi medida no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 340 nm. Após misturar reagente de trabalho e amostra é necessário esperar 2 minutos para fazer a leitura inicial e repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos. Após isso, foi feito o cálculo da média das diferenças de absorvâncias por minuto ($\Delta A/\text{min}$), este valor foi multiplicado por 8095 e o valor final de CK é obtido em U/L.

4.9.1.2. Lactato Desidrogenase

A concentração de Lactato Desidrogenase (LDH) foi obtida por meio de teste cinético utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. A LDH catalisa a redução do piruvato com o NADH , obtendo-se lactato e NAD^+ . A atividade catalítica foi determinada a partir da decomposição do NADH , medida pela queda na absorvância. Em um cubeta termostaticada a 37 °C foi adicionado 20 μL de plasma e 1,0 mL do reagente de trabalho. O reagente de trabalho é a mistura de 4 partes do reagente nº 1 (Substrato Tamponado: Tampão < 200 mmol/L, Piruvato < 6 mmol/L, estabilizante e conservante) com 1 parte do reagente número 2 (Coenzima: Tampão < 100 mmol/L NADH < 5,0 mmol/L e conservante). Após misturar reagente de trabalho e amostra é necessário aguardar 1 minuto para fazer a leitura inicial e repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos. A absorvância foi medida no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados

Unidos) a 340 nm. Após isso, foi feito o cálculo da média das diferenças de absorvâncias por minuto ($\Delta A/\text{min}$) e este valor foi multiplicado por 8016, os resultados foram expressos em U/L.

4.9.1.3. Aspartato aminotransferase

A concentração de Aspartato Aminotransferase (AST) foi obtida por meio de teste colorimétrico utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. A transaminase catalisa a transferência do grupamento amino de um Alfa-aminoácido para um Alfa-cetoácido, o oxalacetato reage com a dinitrofenilhidrazina, a intensidade de coloração da hidrazona formada em meio alcalino é diretamente proporcional a quantidade de oxalacetato em função da atividade enzimática. Inicialmente foi preparado o hidróxido de sódio (0,4 N) pela transferência do conteúdo do frasco N° 3 (Hidróxido de Sódio Concentrado - 40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL completando até a marca com água deionizada livre de CO₂. A seguir, foi feita a curva de calibração usando o padrão (reagente N° 4: Piruvato de Sódio 2,53 mmol/L (22 mg/dL de Piruvato), Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4) e Azida Sódica 7,7 mmol/L), o substrato AST (Reagente N° 1: Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4), Ácido L Aspártico 0,153 mol/L, Ácido Alfa Cetoglutárico 2 mmol/L e Azida Sódica 7,7 mmol/L) e água destilada. Em cada tubo da curva foi adicionado 1,0 mL do Reagente N° 2 (Reagente de Cor: 2,4-Dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e Ácido Clorídrico 1,0 mol/L), cada tubo foi homogeneizado e deixado em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente, a seguir foi adicionado 10,0 mL de Hidróxido de Sódio (0,4 N), seguido de homogeneização e repouso por 5 minutos. A cor permanece estável por 60 minutos. Em outros tubos, foram adicionados 250 μL do reagente N°1, incubado por 3 minutos a 37 °C, em seguida foi adicionado a amostra (100 μL de plasma ou 100 μL de homogenato de tecido hepático) e incubado a 37 °C por 30 minutos, adicionou-se 250 μL do reagente N° 2, homogeneizou-se e deixou em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. A medida da absorvância foi medida no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 505 nm acertando o zero com a água deionizada. Os valores de AST foram calculados através da curva de calibração e os resultados expressos em U/mL.

4.9.1.4. Alanina Aminotransferase

A concentração de Alanina Aminotransferase (ALT) foi obtida por meio de teste colorimétrico utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. A transaminase catalisa a transferência do grupamento amina de um Alfa-aminoácido para um Alfa-cetoácido, o piruvato reage com a dinitrofenilhidrazina, a intensidade de coloração da hidrazona formada em meio alcalino foi diretamente proporcional a quantidade de piruvato em função da atividade enzimática. Inicialmente foi preparado o hidróxido de sódio (0,4 N) pela transferência do conteúdo do frasco N° 3 (Hidróxido de Sódio Concentrado - 40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL completando até a marca com água deionizada livre de CO₂. A seguir, foi feita a curva de calibração usando o padrão (reagente N° 4: Piruvato de Sódio 2,53 mmol/L (22 mg/dL de Piruvato), Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4) e Azida Sódica 7,7 mmol/L), o substrato ALT (Reagente N° 1: Tampão Fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4), L-Alanina 0,2 mol/L, Ácido Alfa Cetoglutárico 2 mmol/L e Azida Sódica 7,7 mmol/L) e água destilada. Em cada tubo da curva foi adicionado 1,0 mL do Reagente N° 2 (Reagente de Cor: 2,4-Dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e Ácido Clorídrico 1,0 mol/L), cada tubo foi homogeneizado e deixado em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente, a seguir foi adicionado 10,0 mL de Hidróxido de Sódio (0,4 N), seguido de homogeneização e repouso por 5 minutos. A cor permanece estável por 60 minutos. Em outros tubos, foram adicionados 250 µL do reagente N°1, incubado por 3 minutos a 37 °C, em seguida foi adicionado a amostra (50 µL de plasma ou 100 µL de homogenato de tecido hepático) e incubado a 37 °C por 30 minutos, adicionou-se 250 µL do reagente N° 2, a amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. A medida da absorbância foi realizada no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 505 nm acertando o zero com a água destilada. Os valores de ALT foram calculados através da curva de calibração e os resultados expressos em U/mL.

4.9.1.5. γ -Glutamil Transferase

A concentração de γ -Glutamil Transferase (GGT) foi obtida por meio de teste cinético utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. A γ -Glutamiltransferase catalisa a transferência do radical Glutamil do substrato para a

glicilglicina formando γ -Glutamilglicina e 5-Amino-2-Nitrobenzoato. A velocidade de formação da 5-Amino-2-Nitrobenzoato é proporcional à atividade da enzima. Para o preparo do Reagente de trabalho será misturado 4 mL do Reagente N° 1 (Tampão < 300 mmol/L, Glicil Glicina > 50 mmol/L e conservante < 30 mmol/L) e 1 mL do Reagente N° 2 (Tampão < 200 mmol/L, Gama Glutamil Carboxi p-Nitroanilida < 100 mmol/L, estabilizante > 150 mmol/L e conservante < 30 mmol/L). A seguir, mistura-se 50 μ L de amostra e 1 mL do Reagente de trabalho em uma cubeta termostatzada a 37 °C, incuba-se por 1 minuto, uma leitura inicial é realizada e repetida após 1, 2 e 3 minutos. A medida da absorbância foi realizada no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 405 nm. Os valores foram calculados através da média das diferenças de absorbâncias por minuto ($\Delta A/\text{min}$) multiplicado por 2638 e expresso em U/L.

4.9.2. Análise dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo

4.9.2.1. Peroxidação Lipídica (Tbars)

Para o procedimento foram misturados 200 μ L de homogenato de tecido hepático ou renal em 150 μ L de tampão fosfato 100 mM. Em seguida, 200 μ L de TCA 10% (10g de Ácido Tricloroacético em 100 mL de água destilada) foi adicionado e as amostras resfriadas a 4 °C/15 minutos. Após o resfriamento as amostras foram centrifugadas a 2200 x g por 15 minutos, o sobrenadante coletado e a 300 μ L do sobrenadante foi misturado 300 μ L de Ácido Tiobarbitúrico (TBA, mistura-se 67g de Ácido Tiobarbitúrico em 1 mL de DMSO e 9 mL de água). As amostras foram aquecidas em banho maria por 2 horas a 95 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente por 15 minutos, a leitura foi realizada em microplaca de 96 poços no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) no comprimento de onda de 532 nm. A concentração foi calculada com base na curva padrão de 1,1,3,3-Tetrametoxi-propano (TMP, 6,07 M) e os valores apresentados em μ [TMP]/mg de proteína (Fraga, Leibovitz e Tappel, 1988).

4.9.2.2. Carbonilação de proteínas

O método inicia-se com a adição de 60 µL de amostra (homogenato total de tecido hepático ou renal) em 60 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em 10 mL de tampão fosfato (H₃PO₄) 0,5 M) e para o branco foi usado somente tampão fosfato (0,5 M) mais 60 µL de amostra. Em seguida, incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz e pipetou-se 30 µL de NaOH (6 M) em todos os poços da placa, incubando-se novamente por 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm e a concentração de grupos carbonila foi calculada usando coeficiente de extinção molar 22,308 M⁻¹ cm⁻¹ para os derivados de hidrazona dos grupos carbonila e expresso em µMoL/mg de proteína. Esse método foi proposto por Mesquita *et al.* (2014).

4.9.2.3. Grupamento Tiol

O grupamento Tiol reage com 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), quebrando as pontes dissulfeto para gerar 2-nitro-5-tiobenzoate (NTB⁻), que se ioniza formando o diânion NTB²⁻. O íon NTB²⁻ apresenta uma coloração amarela. Neste experimento fizemos um branco (20 µL de amostra foi adicionado em 160 µL de tampão tiol e 820 µL de metanol) e um reativo (20 µL de amostra foi adicionado em 150 µL de tampão tiol, 820 µL de metanol e 10 µL de DTNB). Em seguida, incubou-se as misturas por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se por 15 minutos a 3000 g a 25 °C. A absorbância do NTB²⁻ é medida em espectrofotômetro a 412 nm e para o cálculo utiliza-se o coeficiente de extinção molar de 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso em mM de NADPH (Ellman, 1959).

4.9.3. Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.9.3.1. Catalase

A atividade da enzima Catalase foi quantificada como descrito por Aebi (1984). Para tal foi utilizado homogenato de tecido hepático e renal total previamente diluído 250x em tampão fosfato 50 mM pH= 7,0. Em seguida, 10 µL de amostra foi adicionado a 990 µL de tampão fosfato e a mistura incubada a 37 °C. A reação foi iniciada com a adição de 5 µL peróxido de hidrogênio (30%) e acompanhada por 90 segundos, com leitura a cada 15

segundos. A medida da atividade da CAT foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm, que ocorre em resposta a redução do H₂O₂ pela enzima. A concentração final foi calculada por regressão linear e expressa em k.mg de proteína em tecido.

4.9.3.2. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi realizada como descrito por Misra e Fridovich (1972). O método consiste em aferir a inibição da auto-oxidação da adrenalina em adenocromo pela atividade da SOD. A oxidação de adrenalina gera adenocromo que é detectado a 480 nm. 1 U de SOD é definida como a concentração capaz de inibir 50% da oxidação de adrenalina. A 10 µL de amostra foi adicionado 970 µL de tampão glicina (50 mM, pH 10,2), seguido da adição de 10 µL de catalase (0,0024 g/mL). A mistura foi incubada a 32 °C. Após 1 minuto de incubação foi adicionado 17 µl de adrenalina (60 mM), reagente que dispara a reação. As leituras foram realizadas a cada 10 segundos durante 180 segundos a 480 nm. Foi feito um branco sem adição de adrenalina. O cálculo foi feito com base na leitura da auto-oxidação da adrenalina sem a amostra (branco). A concentração final foi calculada por regressão linear e expressa em U/mg de proteína em tecido.

4.9.3.3. Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

Neste método, a GPx converte o peróxido em água oxidando a glutathione (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida a GSH pela enzima glutathione reductase (GR), as custas da oxidação do NADPH em NADP. A diminuição da absorção de luz em 340nm promovida pela oxidação de NADPH foi avaliada durante 5 minutos no meio de reação, que serviu de controle do experimento (composição do meio de reação: tampão fosfato de potássio 100 mM; EDTA 1 mM (pH 7.0); NADPH 0,15 mM, glutathione reduzida 0,5 mM, GR 240 mU/ml e tert-butyl hidroperóxido 1,2 mM, o volume de cada reação foi 1mL). Em seguida, foi adicionado homogeneizado de fígado ou rim (aproximadamente 50mg de proteína) e a oxidação do NADPH continuou sendo monitorada por mais 5 minutos. A atividade da GPx foi calculada subtraindo a taxa de oxidação do NADPH obtida com e sem homogenado (obtida através de regressão linear). O coeficiente de extinção

molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1}$) foi utilizado na determinação da atividade da GPx e esta foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade representou 1 μmol de NADPH oxidado por minuto (Frankenfeld *et al.*, 2014).

4.9.4. Dosagem de Proteína

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976). Inicialmente foi preparado a solução-mãe (25 μL da solução estoque de albumina sérica bovina (BSA) a 10 mg/mL misturado a 475 μL de tampão fosfato 50 mM, pH= 7,4). Em seguida, foi feita a curva padrão misturando diferentes concentrações da solução-mãe e água. Em seguida, as amostras de plasma ou tecido hepático ou renal foram diluídas e 20 μL foi adicionado a 200 μL de Bradford. A absorbância foi medida no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 595 nm. A concentração foi calculada com base na curva padrão de BSA e os valores expressos em mg/mL de proteína.

4.10. Avaliação do Perfil Lipídico

4.10.1. Triglicerídeos

A dosagem de triglicerídeos foi realizada por meio de teste enzimático colorimétrico utilizando kit comercial Bioclin[®], seguindo especificações do fabricante. A formação de H_2O_2 , 4 Aminoantipirina e p-Clorofenol, na presença da peroxidase, darão origem a um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicerídeos. As amostras foram previamente diluídas com cloreto de sódio a 0,85%, na proporção 1:2. Em seguida, foram usados 3 tubos: Branco (1,0 mL de reagente enzimático (Nº 1): tampão, 4-clorofenol < 5 mmol/L, lipase lipoprotéica < 5000 U/L, glicerol quinase < 3000 U/L, peroxidase < 5000 U/L, glicerol-3-fosfato oxidase < 5000 U/L, 4-aminoantipirina < 1 mmol/L, ATP < 5 mmol/L, ativador, estabilizante, surfactante e conservante), padrão (1,0 mL do reagente Nº 1 misturado a 10 μL de reagente Nº 2 – triglicerídeos 100,0 mg/dL e diluente) e amostra (10 μL da amostra misturados a 1,0 mL do reagente Nº 1). As misturas foram incubadas em banho-maria à 37° C por 10 minutos. A absorbância foi medida no aparelho Spectra Max Paradigm (Molecular Devices, Estados Unidos) a 500 nm. O calculo foi realizado diminuindo a leitura da amostra do branco, o

resultado foi multiplicado por 100 e dividido pela amostra do padrão do kit. Os resultados foram expressos em mg/dL.

5. Análise Estatística

Os dados foram descritos como média \pm erro padrão da média. Para todas as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way*, com *post-hoc* de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. A significância aceita para caracterizar diferença foi $p < 0,05$. As análises foram feitas através do programa GraphPadPrism, versão 7.0, para Windows.

6. Resultados

6.1. Análises Biométricas

A tabela 1 mostra o peso corporal antes da cirurgia de ovariectomia (grupos OVX, OVX1, OVX3 e OVX10) e cirurgia simulada (C). Pode ser observado que há uma homogeneidade entre o peso inicial dos animais distribuídos aleatoriamente entre os grupos. O peso corporal final dos animais só aumentou significativamente nos grupos que foram tratados com ND (OVX1, OVX3 e OVX10, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo C, mas o grupo OVX apresenta uma tendência ($p = 0,0659$) ao ganho de peso quando comparado ao grupo C. Estes resultados indicam que as dosagens de ND utilizadas não foram capazes de reduzir o ganho de peso total das ratas OVX.

Uma das características da perda na secreção hormonal é a redução do tamanho do útero. Visando observar se a cirurgia foi eficiente e se o tratamento com ND promoveria alguma alteração neste perfil, o útero das ratas foi pesado ao final de 2 meses de tratamento. Pode ser observado na tabela 1, que todos os grupos OVX apresentaram redução significativa no peso do útero ($p < 0,05$) em relação ao grupo C. Este dado indica que a cirurgia de ovariectomia foi eficiente e induziu a atrofia uterina. Entretanto, os grupos OVX1 e OVX10 tiveram o quadro de atrofia uterina significativamente reduzida quando comparado ao grupo OVX ($p < 0,05$), indicando que essas dosagens podem ser ideais para reverter o quadro de atrofia uterina causado pela cirurgia de ovariectomia. Também pode ser observado uma diferença entre os grupos OVX1 e OVX3 ($p < 0,05$) (Tabela 1). Estas

diferenças no peso do útero não ocorreram em função de diferenças hormonais entre os grupos, visto que ao analisarmos o esfregaço vaginal foi constatado que as ratas ovariectomizadas cessavam seu ciclo estral, mantendo-se em diestro constante, enquanto que os animais do grupo C apresentaram ciclo estral normal durante o período avaliado.

Os depósitos de gordura retroperitoneal apresentaram aumento significativo nos grupos OVX e OVX1 em relação ao grupo C ($p < 0,05$, Tabela 1), já os grupos OVX3 e OVX10 não apresentaram diferença em relação ao grupo C ($p > 0,05$). Estes dados indicam que as dosagens de 3 e 10 mg/kg reduzem o depósito de gordura retroperitoneal, o que pode indicar uma melhora do metabolismo, contudo não foi observada alteração significativa no peso da gordura visceral ($p > 0,05$, Tabela 1).

Visando verificar se o tratamento com ND promoveria alterações de tamanho do coração, da adrenal, baço e timo avaliamos também o peso destes órgãos (Tabela 1). Pode ser observado que o peso do coração sofreu um discreto (15%), porém significativo aumento de peso no grupo que recebeu a maior dose de ND (OVX10) em relação ao grupo C ($p < 0,05$, Tabela 1). Este dado sugere que a dosagem de 10 mg/kg está promovendo uma alteração deletéria no músculo cardíaco. Pode ser observado também que a ovariectomia levou a diminuição significativa do peso da adrenal nos grupos OVX (~42%, $p < 0,05$), OVX1 (~43%, $p < 0,05$) e OVX10 (~56%, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo C. Por outro lado, o grupo tratado com 3 mg/kg (OVX3) de ND não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 1). O peso do baço não foi alterado em nenhum dos grupos avaliados ($p > 0,05$, Tabela 1). Por outro lado, pode ser observado que a dose supra-fisiológica de 10 mg/kg de ND (OVX10) levou a uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso do timo quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com dose fisiológica de 0,1 mg/kg (OVX1), dando indícios de que o timo pode ser alterado por altas dosagens de EAAs (Tabela 1). Além disso, o número de linfócitos totais presentes em linfonodos periféricos foram avaliados, e, não encontramos diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal, de órgãos e tecidos dos animais e contagem de linfócitos dos diferentes grupos experimentais.

Peso	C	OVX	OVX1	OVX3	OVX10
Inicial (g)	191±8,9	187,6±10,01	196±12,1	193±16,1	189,75±10,7
Final (g)	252,5±9,88	294,6±6,80	307,5±25,51	308±10,53 *	317,5±24,95
Útero (g)	0,98±0,22	0,23±0,11 *	0,66±0,23 *#	0,30±0,04 *¶	0,53±0,07 *#
Gordura visceral (g)	1,77±1,08	2,93±1,56	2,76±1,08	2,14±0,9	2,31±0,85
Gordura Retrop. (g)	3,81±1,7	7,9±2,2 *	7,2±2,1 *	6,6±2,2	6,4±1,9
Coração (g)	0,91±0,06	0,96±0,07	0,96±0,11	0,94±0,08	1,04±0,05 *
Adrenal (g)	0,05±0,01	0,032±0,009	0,031±0,01 *	0,036±0,01	0,024±0,006
Baço (g)	0,59±0,05	0,68±0,05	0,70±0,04	0,73±0,17	0,78±0,25
Timo (g)	0,20±0,09	0,31±0,10	0,37±0,17	0,27±0,03	0,18±0,04 ¶
Contagem de Linfócitos (no de linf.x10 ⁴ células/mL)	127,8±85,5	173,1±83,1	237,2±112,3	247,5±212,1	148±84,5

Dados exibidos como a média ± erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-way, com post-hoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

6.2. Biomarcadores de Lesão Celular e Perfil Lipídico

Quando comparado ao controle, a concentração plasmática das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) não foram alteradas no plasma em resposta a ovariectomia, nem ao tratamento com as diferentes doses de ND. Contudo pode ser observado que a enzima CK MB (enzima cardíaca) mostrou-se diminuída em relação ao grupo controle (Tabela 2). Com relação as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e γ -glutamil transferase (GGT), usadas como marcadores plasmáticos de dano hepático, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Tabela 2). Este resultado indica que as doses utilizadas não foram suficientes para lesionar os hepatócitos.

Os triglicerídeos (TGC) foram quantificados para verificar se o tratamento com ND afetaria o conteúdo de TGC circulantes. Pode ser observado na tabela 2 que as dosagens supra-fisiológicas levaram a alterações significativas na concentração destes lipídios no

plasma. O grupo OVX3 apresentou aumento significativo de TGC em relação ao grupo C, OVX e OVX1, já no grupo OVX10 esse aumento só foi significativo quando comparado ao grupo OVX ($p < 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Biomarcadores plasmáticos de lesão celular e triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais.

	C	OVX	OVX1	OVX3	OVX10
CK (U/L)	535,0±535,02	621,6±272,6	665,0±201,9	600,4±195,2	780,7±95,1
LDH (U/L)	426,2±187,2	319,8±145,4	428,3±205,8	262,0±98,4	424±157
CK MB (U/L)	201±68	98,9±66,6	126,2±94,5	44,4±11,3 #	117,2±26,6
AST (U/mL)	12,05±0,07	12,08±0,17	12,11±0,17	12,24±0,23	12,64±1,51
ALT (U/mL)	12,096±0,07	12,13±0,17	12,16±0,17	12,28±0,23	12,69±1,51
GGT (U/L)	9,11±5,55	10,08±5,05	10,31±6,12	7,85±1,21 106,8±4,72	8,6±2,96
TGC (mg/dL)	92,53±5,38	87,2±4,17	94,4±8,87	*#¶	98,6±3,62 #

Creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase cardíaca (CK MB), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e γ -glutamil transferase (GGT) e triglicerídeos (TGC). Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=5; OVX1, n=7, OVX3, n=4 e OVX10, n=5.

Embora não tenha sido observado alteração nos biomarcadores de lesão hepática no plasma, avaliamos a concentração destas enzimas no tecido visando confirmar que o mesmo se mantinha preservado. Pode ser observado na tabela 3 que a nível tecidual, as enzimas AST e ALT também não apresentaram mudanças significativas, corroborando com os resultados encontrados no plasma. Além disso, avaliamos a concentração de TGC presente no tecido hepático e não foi observado alteração entre os grupos ($p > 0,05$, Tabela 3). Estes dados indicam que o fígado não está sofrendo lesão em resposta ao uso de diferentes doses de ND, tampouco há acúmulo lipídico no tecido.

Tabela 3. Conteúdo hepático de transaminases e triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais.

	C	OVX	OVX1	OVX3	OVX10
AST (U/mL)	340,7±81,02	323,2±59,56	362,0±61,01	340,4±94,15	368,7±76,79
ALT (U/mL)	455,6±107,11	433,4±90,56	465,8±52,70	427,7±128,65	492,3±93,14
TGC (mg/dL)	6220,1±1865,29	8204,3±3164,30	8646,0±4386,13	9933,2±4095,84	11412,6±6329,83

Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e dos triglicerídeos (TGC) em homogenato de tecido hepático total. Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

6.3. Biomarcadores de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes

6.3.1. Tecido Hepático

Ao avaliarmos o estresse oxidativo no tecido hepático, foi verificado um aumento significativo (~58%, $p < 0,05$) na peroxidação lipídica (PL) no grupo tratado com a maior dosagem de ND (OVX10) em relação ao grupo C (Fig. 3A). Apesar da PL não estar significativamente aumentada no grupo OVX3 observamos uma tendência ao aumento nesse marcador em relação ao grupo C (~52,5, $p = 0,062$). A carbonilação de proteínas e a formação de grupamento tiol não foi alterada pela ovariectomia e nem pelo tratamento com ND ($p > 0,05$, Figura 3B e C).

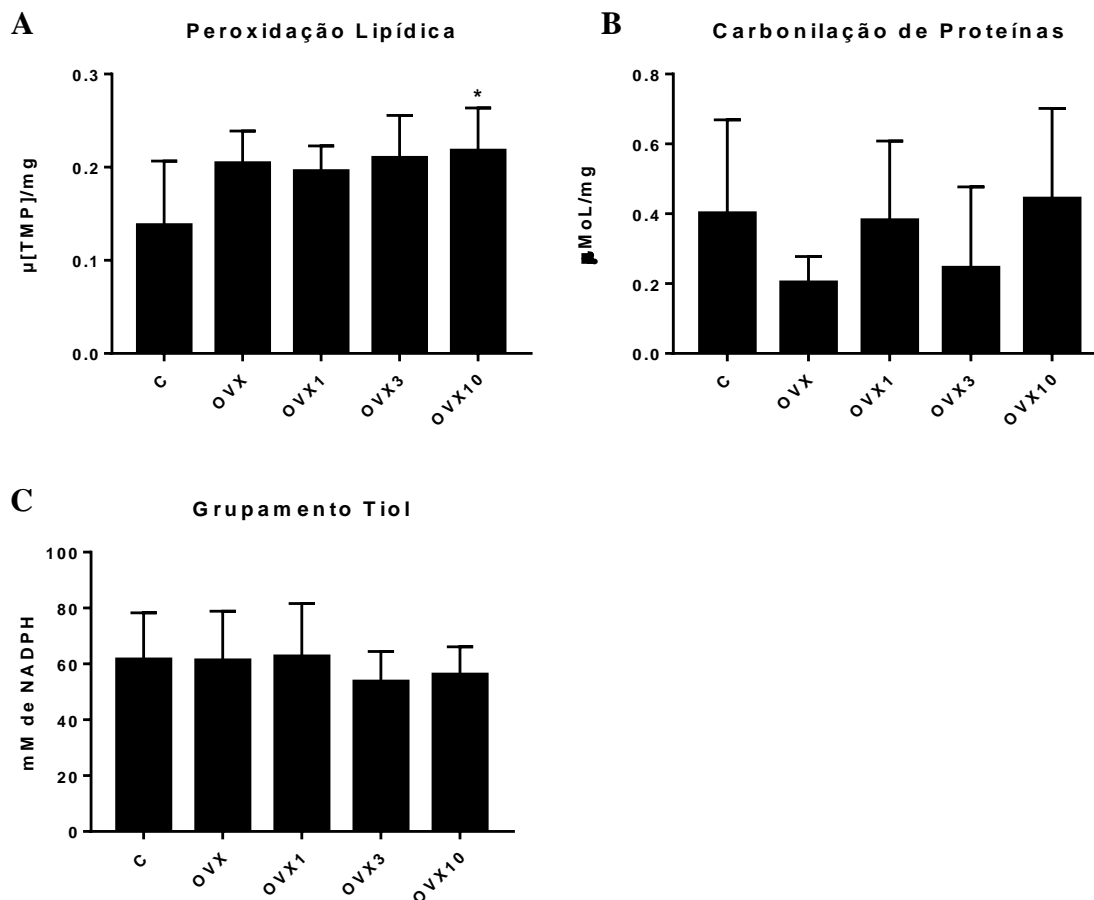


Figura 3. Dosagens biomarcadores de estresse oxidativo em homogenato de tecido hepático total. A. Peroxidação lipídica. B. Carbonilação de proteínas. C. Formação de grupamento tiol. Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

Visando avaliar se a atividade das enzimas antioxidantes foram alteradas pelos diferentes tratamentos, estas foram dosadas no tecido hepático. Pode ser observado na figura 2 que a atividade da enzima catalase está significativamente aumentada no grupo OVX10 quando comparada ao grupo C ($p=0,03$). Pode ser observado também que o grupo que recebeu a dose fisiológica de 0,1 mg/kg (OVX1) apresenta uma tendência ao aumento da atividade dessa enzima quando comparado ao grupo C ($p=0,07$) (Fig. 4A). Assim como a atividade da catalase, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento significativo somente no grupo OVX10 quando comparada ao grupo controle ($p=0,0049$) (Fig. 4B). Contudo, vale ressaltar que a atividade da SOD foi

significativamente maior quando comparado com os grupos OVX ($p=0,0043$), e OVX1 ($p=0,014$) e OVX3 ($p=0,001$) (Fig. 4B). Por outro lado, a atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) se mostrou diminuída em resposta ao tratamento com ND nas dosagens suprafsiológicas em relação ao controle (Fig. 4C). O grupo OVX3 apresentou redução da atividade enzimática não só ao grupo controle ($p=0,0009$) mas também em relação ao grupo OVX ($p=0,0360$). Já o grupo OVX10 apresentou diferença significativa em relação não só ao grupo controle ($p=0,0006$), mas também em relação aos grupos OVX ($p=0,0234$) e OVX1 ($p=0,0411$) (Fig. 4C).

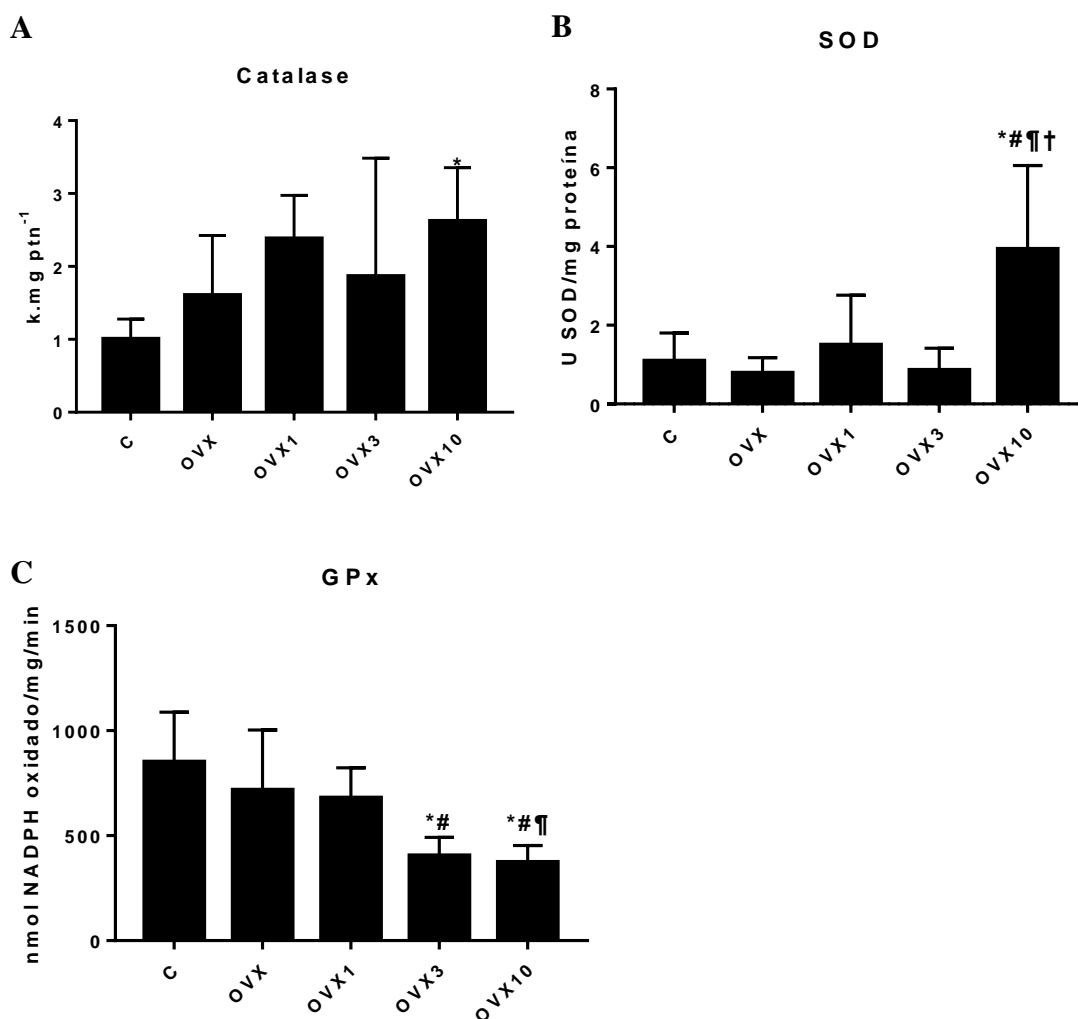


Figura 4. Análise da atividade das enzimas antioxidantes em homogenato de tecido hepático total. A. Atividade da catalase. B. Atividade da superóxido dismutase (SOD). C. Atividade da glutationa peroxidase (GPx). Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-

way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

6.3.2. Tecido Renal

Tendo em vista que o rim é responsável pela filtração do sangue e, portanto, todos os subprodutos do metabolismo são filtrados por este órgão, fomos avaliar se o uso de ND alteraria o balanço redox deste tecido. Pode ser observado na figura 5, que não houve alteração significativa com relação as marcadores de estresse oxidativo no rim em nenhum dos diferentes grupos experimentais avaliados.

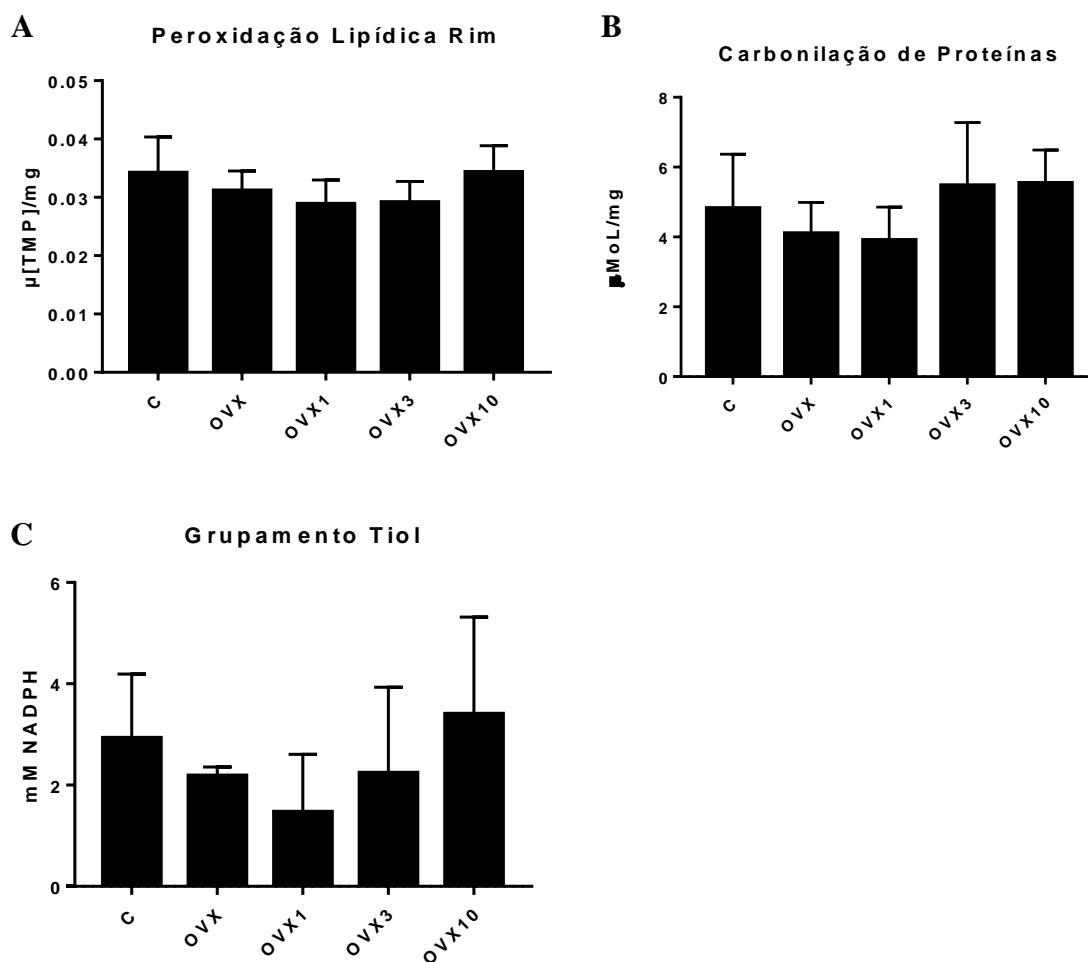


Figura 5. Biomarcadores de estresse oxidativo em homogenato de tecido renal total. A. Peroxidação lipídica; B. Carbonilação de proteínas; C. Formação de grupamento tiol. Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A comparação foi realizada por ANOVA one-way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

A ausência de alteração dos marcadores de estresse oxidativo, pode indicar que ou não houve estresse oxidativo neste tecido, ou o sistema antioxidante foi modulado positivamente. Visando avaliar esta segunda hipótese, a atividade das enzimas antioxidantes foram avaliadas. A atividade da catalase se apresentou aumentada significativamente no grupo OVX1 e OVX3 ($p=0,03$) em relação ao grupo controle. O grupo OVX3 ainda apresenta diferença significativa em relação ao grupo OVX ($p=0,04$) (Fig. 6A). A atividade das enzimas SOD e GPx não foram alteradas em resposta aos diferentes tratamentos (Fig. 6B e C). Este resultado indica que o aumento da atividade da catalase (Fig. 6A) pode estar protegendo o tecido renal, evitando que haja aumento dos marcadores de estresse oxidativo como observado na figura 5.

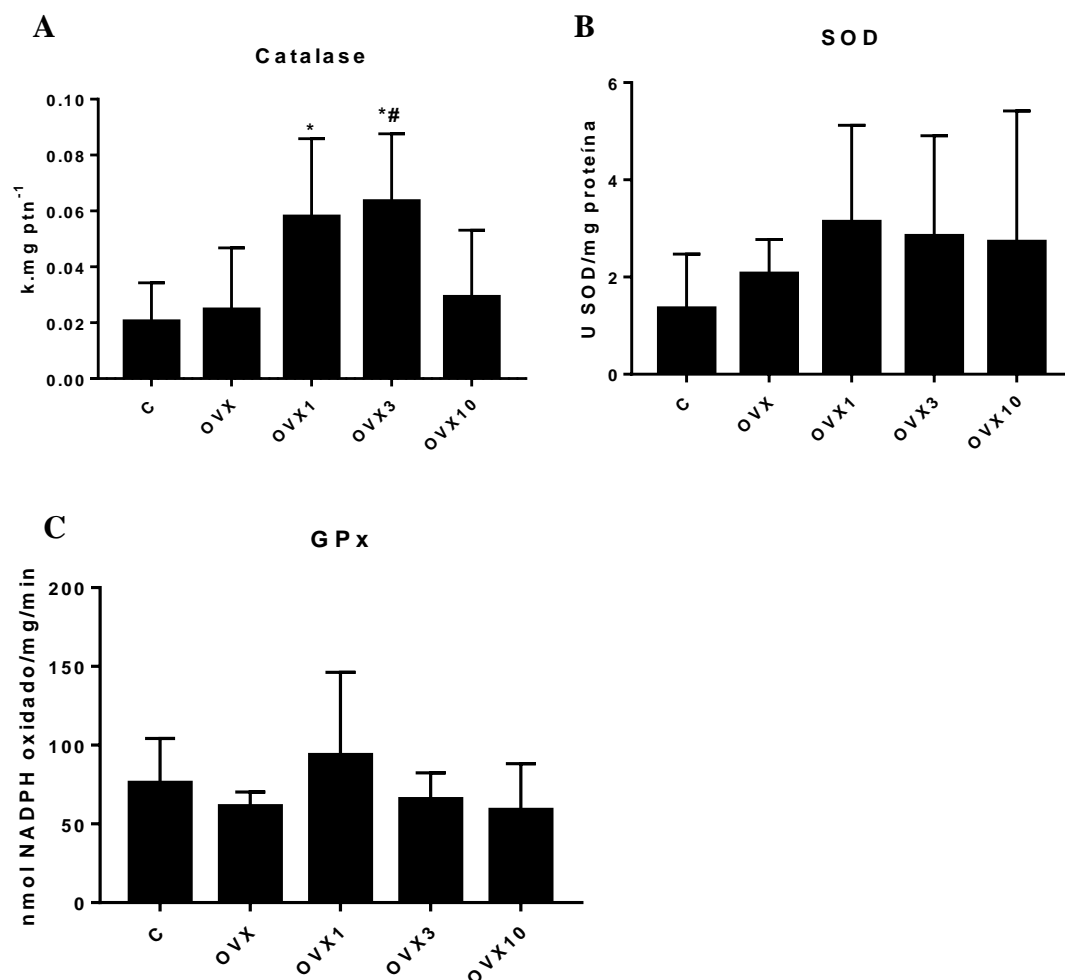


Figura 6. Atividade das enzimas antioxidantes em homogenato de tecido renal total. A. Catalase, B. Superóxido dismutase (SOD) e C. Glutaciona peroxidase (GPx). Dados exibidos como a média \pm erro padrão. * vs C, # vs OVX, ¶ vs OVX1 e † vs OVX3. A

comparação foi realizada por ANOVA one-way, com posthoc de Tukey. $p < 0,05$. C, n=7; OVX, n=6; OVX1, n=7, OVX3, n=7 e OVX10, n=6.

7. Discussão

O presente estudo objetivou determinar os efeitos da Terapia Hormonal da Menopausa (THM) usando diferentes doses de Esteroide Anabolizante Androgênico (EAA), através da avaliação dos marcadores de lesão celular e parâmetros bioquímicos (estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes) em ratas ovariectomizadas (OVX).

A Declaração de Helsinque estabelece as normas básicas de pesquisas em seres humanos, prevendo a indispensabilidade do consentimento voluntário, a necessidade de estudos prévios em laboratórios e em animais, a análise de riscos e benefícios da investigação proposta, a liberdade do sujeito da pesquisa em se retirar do projeto e a adequada qualificação científica do pesquisador (Freitas, 1997). Tendo em vista que terapias alternativas podem trazer risco a saúde quando não testadas previamente, os modelos experimentais animais são utilizados, principalmente, graças as suas características genéticas, biológicas e comportamentais serem muito parecidas (Chakraborty *et al.*, 2009). Entre esses modelos animais estão os roedores, esses animais apresentam flutuações hormonais semelhante as das mulheres e entram em uma estropausa, semelhante a menopausa verdadeira, caracterizada pelo ciclo irregular na meia-idade, seguido de estro persistente até o fim da vida, com interrupção completa dos ciclos reprodutivos (Maffuci e Gore, 2006 e Frick, 2008). Nosso trabalho avaliou a ciclicidade dos animais e verificou que após a cirurgia de ovariectomia, a fase de estro se tornou persistente em todos os grupos controle (OVX) e tratados (OVX1, OVX3 e OVX10), mas se manteve normal no grupo onde foi realizada cirurgia simulada (C), indicando que a retirada dos ovários foi eficiente na interrupção do ciclo reprodutivo. Outro parâmetro avaliado para comprovar a eficiência da cirurgia de ovariectomia foi o peso do útero, o qual sofre atrofia graças a redução dos níveis de hormônios circulantes. Nossos dados mostram que em todos os grupos OVX houve atrofia uterina. O tratamento com as doses 0,1 e 10 mg/kg reduziu a atrofia uterina quando comparado ao grupo OVX, o que promoveu um aumento do peso no útero, mas ainda não o suficiente para se igualar ao grupo C. Dados de Borges *et al.* (2018) também mostraram uma diminuição do peso do útero em ratas ovariectomizadas

($0,02\pm 0,003$) em relação ao grupo controle ($0,09\pm 0,01$) corroborando com os nossos resultados. Visto que a ND pode ser convertida em estrogênio pela enzima aromatase, podemos dizer que a diminuição na atrofia uterina ocorreu graças ao tratamento com ND.

Estudos anteriores já mostraram que a ovariectomia causa uma diminuição significativa nos níveis circulantes de estradiol, o que confirma a eficácia do procedimento cirúrgico para simular o período da menopausa (Monteiro et al., 2005b, Waynforth e Flecknell, 1992).

O mecanismo pelo qual a falta dos hormônios ovarianos afetam a fisiologia feminina ainda não está completamente compreendido. No entanto, já sabemos que a falta desses hormônios devido a insuficiência ovariana durante a menopausa ou remoção cirúrgica dos ovários (ovariectomia) está associada ao desenvolvimento de diversos efeitos adversos como: obesidade e dislipidemia (Vasconcellos et al., 2004, Wang et al., 2012 e Anikó et al., 2015). Nossos dados mostram um aumento no peso total do corpo dos animais após cirurgia de ovariectomia e tratamento com ND, no entanto, nos grupos OVX3 e OVX10 esse aumento não pode ser caracterizado pelo aumento dos depósitos de gordura retroperitoneal, que está significativamente aumentada nos grupos OVX e OVX1. Podemos dizer que o tratamento com doses supra fisiológicas regulou positivamente esses depósitos de gordura, levando a sua diminuição, mas a dose de $0,1\text{mg/kg}$ não modificou esse parâmetro. Além disso, podemos supor que as doses supra fisiológicas estão alterando o peso de outros órgãos ou tecidos para justificar o aumento no peso corporal total, mas entre os órgãos analisados não encontramos alterações que justifiquem esse aumento do peso do corpo.

Os níveis de triglicerídeos (TGC) possuem uma estreita relação com a dieta e consumo de energia, e pode ser influenciado pelos hormônios sexuais (Armellini et al., 2000). Em nosso estudo, o ND levou ao aumento dos TGC nos grupos que receberam doses supra fisiológicas (OVX3 e OVX10). Quando comparamos com o trabalho de Estrada-Cruz et al. (2018) que tratou ratas ovariectomizadas com tibolona (1 mg/kg) encontramos uma diferença em relação aos nossos dados, esses autores mostraram que ocorre uma diminuição na quantidade de TGC circulantes ($34,55\pm 7,79$) no grupo tratado quando comparado ao grupo OVX controle ($71,53\pm 4,33$). Teixeira et al. (2018) não encontraram alteração nos níveis de TGC em ratas ovariectomizadas sacrificadas em diferentes idades

após a cirurgia. No entanto, Borges et al. (2018) mostraram um aumento significativo na quantidade de TGC em ratas ovariectomizadas ($0,9\pm 0,1$) quando comparado ao grupo controle ($0,6\pm 0,2$) após 12 semanas. Quando os níveis de TGC foram avaliados em usuários de doses supra-fisiológicas de diferentes EAAs foi verificado que somente após 24 meses, seus níveis foram diminuídos em relação ao início do tratamento (Bonetti et al., 2008). Ao contrário de outros trabalhos, nossos dados mostram que somente com o uso de doses supra-fisiológicas de ND a quantidade de TGC circulantes é alterada em ratas ovariectomizadas, esse aumento pode ser dependente do tempo após cirurgia de ovariectomia ou podemos supor que a taxa de lipólise pode estar elevada, aumentando a quantidade de TGC no plasma. Contudo, podemos afirmar que embora haja aumento de TGC nos grupos com dosagens supra-fisiológicas de ND, este aumento não está levando ao acúmulo de TGC no fígado (Tabela 3).

Nossos dados mostraram que o peso do coração e os níveis da enzima CK-MB, biomarcador de injúria cardíaca, estavam significativamente alteradas nos grupos tratados com doses supra-fisiológicas de ND OVX10 e OVX3, respectivamente. Casos onde adaptações estruturais no tecido cardíaco e nos níveis enzimáticos após o uso abusivo de EAA já foram descritos na literatura por vários autores (Fleck et al., 1993, Fineschi et al., 2001, D'Andrea et al., 2007, Kasikcioglu et al., 2009, Thiblin et al., 2015, Almaiman et al., 2018), portanto nossos dados corroboram com os dados da literatura no que diz respeito a dosagens supra-fisiológicas. Vale ressaltar que a dosagem fisiológica não promoveu aumento do peso do coração e tampouco do marcador de lesão cardíaca CK-MB (Tabela 1 e 2), o que sugere que esta dosagem não promove lesão cardíaca.

A reposição hormonal com ND em ratas ovariectomizadas por 2 meses não alterou os níveis plasmáticos de AST e ALT, marcadores de dano muscular e indiretamente de dano hepático e GGT, marcador específico de dano hepático. Almaiman et al., (2018) relataram que o aumento dessas aminotransferases são dependentes da dose e do tempo em que são usadas as EAAs, visto que os autores só detectaram aumento significativo dessas enzimas em usuários após um período de 30 meses. Quando essas aminotransferases são avaliadas em mulheres pós-menopausa não foram encontradas alterações nos níveis plasmáticos de AST, mas ALT ($21,40\pm 13,14$) e GGT ($26,05\pm 32,86$) estão aumentadas em mulheres que apresentam sintomas vasomotores muito grave em relação a mulheres que

apresentam esses sintomas moderados ($18,86 \pm 11,24$ e $23,77 \pm 26,08$, respectivamente) (Ryu et al., 2018).

Estudos mostram que a secreção de DHEA (dihidroepiandrosterona) diminui em mulheres na pós menopausa, além disso, foi mostrado que a expressão de ER α e ER β na glândula adrenal diminui em animais OVX (Zhang et al., 2018 e Labrie, 2018). A redução desses hormônios poderia estar regulando negativamente o peso da adrenal nos animais OVX do nosso trabalho e a reposição com diferentes doses de ND não foi suficiente para reverter esse quadro.

Apesar do peso do timo estar diminuído em animais OVX10 quando comparado ao grupo OVX1, não foram encontrados alterações no número de linfócitos totais presentes em linfonodo periférico. Já foi mostrado que o início da involução tímica está associada à idade e coincide com o aumento nos níveis de esteroides gonadais circulantes durante a puberdade (Bodey *et al.*, 1997). Oner e Ozan (2002) mostraram que o aumento nos níveis de esteroides circulantes (testosterona ou estrogênio), induzido pela administração exógena, levou a atrofia tímica em roedores semelhante à atrofia observado pelo envelhecimento. Estes dados da literatura corroboram com os dados obtidos em nosso estudo onde a administração de altas dosagens de EAA levou a atrofia tímica.

Quando os marcadores de lesão celular (AST e ALT) e os TGC foram avaliados em homogenato total de tecido hepático não encontramos alterações após tratamento de ratas ovariectomizadas com ND. Nossos resultados diferem dos resultados de Borges et al. (2018) em tecido hepático. Esses autores observaram um aumento significativo em ALT ($21,67 \pm 2,2$) e TGC ($2,4 \pm 0,5$) em ratas ovariectomizadas em relação ao grupo controle ($15,5 \pm 3,6$ e $1,2 \pm 0,4$, respectivamente) após 12 semanas. Com base nestes resultados, acreditamos que o tempo de tratamento não foi suficiente para induzir dano hepático nas ratas OVX. Além disso, mostramos que o tratamento com ND (0,1, 3 e 10 mg/kg) por 8 semana não promoveu lesão no tecido hepático e não levou ao acúmulo de TGC no fígado, o que levaria a uma estatose hepática. Portanto, acreditamos que a nível hepático as dosagens de ND e o tempo utilizado não promoveram efeito deletério ao fígado.

Investigamos alguns marcadores de estresse oxidativo, como danos aos lipídios e proteínas e a formação de grupamento tiol, bem como as atividades das enzimas

antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) nos tecidos hepático e renal.

No trabalho de Li et al. (2018) foi mostrado que o tratamento com luteína reduziu a peroxidação lipídica sérica em ratas OVX, as quais apresentavam menores níveis de atividade de enzimas antioxidantes em comparação com ratas controle. Os autores verificaram que após o tratamento com luteína houve um aumento significativo do status antioxidante em comparação aos ratos OVX. Outros trabalhos mostram um declínio da atividade antioxidante e aumento das EROs no tecido ósseo em quadros de osteoporose característicos da menopausa (Ha et al., 2004 e Sánchez-Rodríguez et al., 2007). Mada et al., (2017) mostraram que houve um aumento na peroxidação lipídica e diminuição na atividade da CAT e da SOD em ratas OVX, mas após o tratamento com um peptídeo antioxidante do leite (PEP, peptídeo VLPVPQK) em diferentes doses (50 e 100 ug/kg) por 8 semanas, a atividade antioxidante aumentou e conseqüentemente houve redução da peroxidação lipídica. Siebert et al., (2018) avaliaram o estresse oxidativo no hipocampo de ratas OVX e observaram a atividade da catalase aumentada no grupo OVX ($0,83 \pm 0,20$) em relação ao grupo C ($0,57 \pm 0,15$), e a peroxidação lipídica nesse tecido não foi alterada, ao contrário do que havia sido demonstrado em outros tecidos, como descrito acima. Com base na literatura, fica claro que as ratas OVX são propensas a um quadro de estresse oxidativo sistêmico. Neste trabalho não verificamos alteração significativa nos marcadores de estresse oxidativo a nível renal, o que difere do que foi demonstrado no sangue e tecido ósseo, mas corrobora com o que foi observado no hipocampo. Contudo, as ratas OVX apresentaram níveis significativamente mais altos de peroxidação lipídica no tecido hepático quando submetidas a doses suprafisiológicas de ND (OVX10) em comparação aos animais do grupo C. Juntamente a essas mudanças também notamos um aumento significativo na atividade antioxidante, caracterizado pelo aumento da atividade da enzima CAT e SOD no mesmo grupo. Nesse caso, nossos dados se contrapõem a alguns modelos encontrados na literatura, onde o aumento da taxa de peroxidação lipídica é acompanhada pela diminuição da defesa antioxidante quando esses parâmetros são avaliados sistemicamente, mas podemos ver que quando comparamos tecido cerebral (hipocampo) e tecido hepático encontramos uma resposta antioxidante parecida nesses tecidos.

Alguns trabalhos mostraram que a presença de EROs pode levar a regulação positiva de enzimas antioxidantes como estratégia adaptativa contra o estresse oxidativo (Finkel e Holbrook, 2000; Halliwell e Gutteridge, 2007a; Halliwell e Whiteman, 2004; Poljsak e Milisav, 2013). Portanto, a ativação da SOD observada em ratas submetidas ao tratamento com ND, no grupo OVX10, pode resultar no aumento de H₂O₂, que leva a ativação da CAT, esta, por sua vez converte o H₂O₂ em água e oxigênio numa tentativa de reduzir as taxas de peroxidação lipídica dos hepatócitos. Esse mecanismo antioxidante é importante pois inibe a formação de radical hidroxila (OH •) que é altamente reativo, podendo alterar estruturas celulares e inibir a homeostase enzimática, das membranas e ácidos nucleicos (Martindale e Holbrook, 2002). Este dado está de acordo com a manutenção dos níveis de transaminaes hepáticas e plasmáticas observada nos diferentes grupos experimentais.

Ao avaliarmos a atividade da enzima glutathiona peroxidase no tecido hepático, vimos que o tratamento com doses supra fisiológicas (OVX3 e OVX10) leva a diminuição da atividade dessa enzima. Nos trabalhos de Schüller et al. (2018) e Estrada-Cruz et al. (2018) foram mostrados que o tratamento de ratas OVX com ácido docosahexaenoico (DHA) ou ácido eicosapentaenoico (EPA) e tibolona, respectivamente, também levaram a redução da atividade dessa enzima quando analisado em tecido hepático e soro, respectivamente, corroborando com nossos dados e indicando que a atividade dessa enzima é bastante sensível a diferentes tratamentos em ratas OVX.

Em um estudo recente, ratos Wistar machos foram tratados com 10 mg de ND três vezes por semana durante seis semanas e diversos parâmetros bioquímicos foram analisados para verificar a toxicidade do uso desse fármaco no tecido renal. Foi verificado que o uso de ND altera os níveis de creatinina e ureia na urina, eleva a quantidade de mRNA para podocina e nefrina, além de aumentar o conteúdo de 8-OHdG (8-hidroxi-desoxiguanosina), um marcador de dano ao DNA, mas não altera a capacidade antioxidante total. Além disso, análises histológicas mostraram aumento de fibrose com dano definitivo à arquitetura dos rins e aumento de células PCNA-positivas (antígeno nuclear da célula em proliferação) em diferentes compartimentos renais (Tofghi et al., 2018).

Entre os vários efeitos adversos da administração de EAAs, podemos notar que o impacto desse tratamento na função renal tem recebido pouca atenção e poucos trabalhos

relacionando seu uso em ratas ovariectomizadas foram encontrados. Gross et al. (2004) e Doublier et al. (2011) mostraram que o tratamento com estrogênios preveniu a perda de podócitos e as lesões renais em ratas ovariectomizadas sugerindo que essas células podem ser alvos da ação do estrogênio. Além disso, foi mostrado que o tratamento de podócitos com concentrações fisiológicas de estrogênio (0,05 mg/pellet/90 dias) preveniu a apoptose, efeito este dependente de ER (receptor de estrógeno) (Doublier et al., 2011). Outros estudos mostraram que o estrogênio é capaz de prevenir a apoptose em vários tipos de células, incluindo células mesangiais e tubulares (Verzola et al., 2004 e Blush et al., 2004) e que o tratamento de podócitos com estrogênio (E2) foi capaz de prevenir a apoptose induzida por tratamento com testosterona (T), indicando que um desequilíbrio entre as concentrações de estrogênio e testosterona poderiam ter um papel patogênico *in vivo*. Além disso, é sabido que a produção de T pelos ovários persiste nas mulheres após a menopausa, alterando a proporção de E2 para T em favor de T, e, desta forma pode contribuir para a progressão mais rápida da doença renal crônica em mulheres após a menopausa (Haroun et al., 2003, Jafar et al., 2003, Neugarten et al., 2000, Seliger et al., 2001). Nossos dados mostram que o uso de ND em doses fisiológicas ou supra-fisiológicas em ratas ovariectomizadas por um período de 2 meses, não alterou o equilíbrio redox do tecido renal, visto que a peroxidação lipídica, a carbonilação de proteínas e a formação de grupamento tiol não foram alteradas. Além disso, verificamos que a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx não foram alteradas. Contudo, a ND nas dosagens de 0.1 e 3 mg/kg promoveu o aumento da atividade da enzima catalase. Comparando com um estudo realizado em camundongos machos, foi mostrado que o tratamento com doses fisiológicas (3,75 mg) e supra-fisiológicas (10 mg) de ND, 2 vezes por semana, aumenta a peroxidação lipídica nos rins, bem como leva a diminuição na atividade da enzima GPx (Riezzo et al., 2014). Com base em nossos resultados podemos sugerir que em fêmeas ovariectomizadas a capacidade de eliminar o peróxido de hidrogênio poderia estar aumentada devido a ativação de ER, visto que a ND pode ser convertido em estrogênios através da aromatase, levando ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes, como visto para catalase, o que reduz o estresse oxidativo renal nas fêmeas em comparação com os machos.

Não podemos descartar a presença de um aumento na produção de radicais livres nos tecidos hepático e renal desses animais. Mesmo que os marcadores de estresse

oxidativo (carbonilação de proteínas e formação de grupamento tiol no tecido hepático e peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e formação de grupamento tiol no tecido renal) não tenham sido alterados, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD no fígado e CAT nos rins podem estar refletindo um mecanismo compensatório para a produção de espécies reativas presentes ao longo do tempo após a ovariectomia e tratamento com ND. Porém podemos descartar que haja estresse oxidativo e lesão celular com base nos marcadores avaliados neste trabalho.

Outro possível mecanismo das alterações encontradas nesses tecidos pode estar relacionado com a conversão do ND em 17- β -estradiol a partir da enzima aromatase, no entanto essa molécula é tóxica, genotóxica e cancerígena (Torres-Bugarín et al., 2007). Tendo em vista que não observamos aumento significativo de marcadores de lesão e de estresse oxidativo, podemos inferir que a conversão do ND em 17- β -estradiol não foi grande o suficiente para promover uma ação tóxica e deletéria.

Nos dias atuais, as terapias com EAA estão sendo cada vez mais empregadas, e podem variar de acordo com o tipo de fármaco, a concentração administrada e o tempo de uso. Essas terapias envolvem, por exemplo, o uso em disfunção no sistema endócrino, especificamente no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, em homens com hipogonadismo e com retardo no crescimento. Além disso, os esteroides são utilizados no tratamento de sarcopenia, anemias severas, carcinoma mamário e osteoporose (Strawford, 1999, Hartgens et al., 2001). Portanto, saber a forma correta de utilização desses medicamentos é de extrema importância para a saúde. Além disso, o modelo experimental utilizado no trabalho associa variáveis complexas e a compreensão dos efeitos do decanoato de nandrolona associado à ovariectomia sobre o equilíbrio redox dos tecidos hepático e renal é de grande relevância e requer estudos complementares para elucidação dos mecanismos envolvidos.

8. Conclusões

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que a ovariectomia foi eficiente em simular o período da menopausa levando a atrofia uterina e alteração no peso da glândula adrenal.

As dosagens suprafisiológicas de ND levaram ao remodelamento de alguns tecidos como coração e timo, sendo que, a dosagem de 3 mg/kg também levou a diminuição na concentração plasmática de creatina quinase cardíaca.

A dosagem de 10mg/kg de EAA promoveu o aumento de triglicerídeos circulantes.

No tecido hepático a dose de 10 mg/kg (OVX10) promoveu o aumento na peroxidação lipídica, e aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.

EAA nas dosagens de 3 e 10 mg/kg promoveram a diminuição na atividade da enzima glutathione peroxidase. Já no tecido renal, somente a atividade da enzima catalase foi alterada nos grupos OVX1 e OVX3.

Com base nesses dados podemos concluir que o tratamento com a dose fisiológica de 0,1 mg/kg (OVX1) não afetou negativamente os parâmetros sistêmicos e nem o equilíbrio redox do tecido hepático e renal, indicando que o ND nesta dosagem pode ser uma alternativa promissora para realizar a Terapia Hormonal da Menopausa.

9. Referências

- Abbas, A.M., Elsamanoudy, A.Z. (2011). Effects of 17beta-estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 89, 497–504.
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Ahima, R.S. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity.* Silver Spring. 14, 242S–9S.
- Aldrighi, J.M., Aldrighi, C.M.S., Aldrighi, A.P.S. (2002). Alterações sistêmicas do climatério. *Rev Bras Med.* 59, 15–21.
- Amsterdam, J., Opperhuizen, A., Hartgens, F. (2010). Adverse health effects of anabolic–androgenic steroids. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 57, 117–123.
- Andrade, T.U., Santos, M.C., Busato, V.C., Medeiros, A.R., Abreu, G.R., Moysés, M.R., et al. (2008). Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold–Jarish reflex control of bradycardia. *Arch. Med. Res.* 39, 27–32
- Asdell, S.A., Doornenbal, H., Joshi, S.R., Sperling, G.A. (1967). The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats. *J. Reprod. Fertil.* 14, 113–120.
- Bagatell, C.J. e Bremner, W.J. (1996). Androgens in men – uses and abuses. *N. Engl. J. Med.* 334, 707–714.
- Bahrke, M.S., Yesalis, C.E. (2004). Abuse of anabolic-androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 614–620.
- Bahrke, M.S., Yesalis, C.E., Kopstein, A.N., Stephens, J.A. (2000). Risk factors associated with anabolic–androgenic steroid use among adolescents. *Sports Med.* 29, 397–405.
- Baird, D.T. e Guevara, A. (1969). Concentration of Unconjugated Estrone and Estradiol in Peripheral Plasma in Nonpregnant Women Throughout the Menstrual Cycle, Castrate and Postmenopausal Women and in Men. *J. Clin. Endocr.* 29:149.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 120, 483–95.
- Baldo-Enzi, G., Giada, F., Zuliani, G., Baroni, L., Vitale, E., Enzi, G., Magnanini, P., Fellin, R. (1990). Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self-administration of anabolic steroids. *Metabolism.* 39, 203–208.
- Ben, J., Soares, F.M., Cechetti, F., Vuaden, F.C., Bonan, C.D., Netto, C.A., Wyse, A.T. (2009). Exercise effects on activities of Na (+), K (+) -ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Res.* 1302, 248–255.
- Benedusi, V., Martini, E., Kallikourdis, M., Villa, A., Meda, C., Maggi, A. (2014). Ovariectomy shortens the life span of female mice. *Oncotarget.* 6, 10801–10811.
- Bergink, E., Geelen, J.A.A., Turpijn, E.W. (1985). Metabolism and receptor binding of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions. *Acta Endocrinol.* 110, 31–37.
- Bhalla, A.K. (2010). Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best practice & research Clinical Rheumatology.* 24, 313–27.

- Bhasin, S., Woodhouse, L., Casaburi, R., Singh, A.B., Bhasin, D., Berman, N., et al. (2001). Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 281, E1172–81.
- Birch, A.J. (1950). Hydroaromatic steroid hormones 10-Nortestosterone. *J Chem Soc.* 367-368.
- Bismar, H., Diel, I., Ziegler, R., Pfeilschifter, J. (1995). Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab.* 80, 3351–5.
- Bisschop, A.; Gayan-Ramirez, G.; Rollier, H.; Dekhuijzen, P.N.; Dom, R.; De Bock, V.; et al. Effects of nandrolone decanoate on respiratory and peripheral muscles in male and female rats. *J. Appl. Physiol.* 82, pp. 1112–1118. 1997.
- Bissoli, N.S., Medeiros, A.R.S., Santos, M.C.S., Busato, V.C.W., Jarske, R.D., Abreu, G.R., et al. (2009). Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold–Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. *Pharmacol. Res.* 59, 379–384.
- Blasberg, M.E. e Clark, A.S. (1997). Anabolic androgenic steroid effects on sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 32, 201–208
- Bodey B, Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE: Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. *In Vivo* 1997; 11:421–440.
- Boelsterli, U.A. (2002). Mechanisms of nsaid-induced hepatotoxicity. *Drug Saf.* 25, 633–48.
- Bohigian, G.M., Estes, E.H., et al. (1988). Drug abuse in athletes: anabolic steroids and human growth hormone. *JAMA.* 259, 1703-5.
- Bond, P., Llewellyn, W., Van Mol, P. (2016). Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Medical Hypotheses.* 93, 150–153.
- Bordbar, H., Mesbah, F., Talaei, T., Dehghani, F., Mirkhani, H. (2014). Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. *J. Med. Sci.* 39, 44–50.
- Bossemeyer, R. (1999). Aspectos gerais do climatério. *Climatério Feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento.* 17–33.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 7, 248–54.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 142.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, Jr.F.J., Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Weekly.* 142.
- Britton, R.S. (1996). Metal-induced hepatotoxicity. *Seminars in liver disease.* 16, 3–12.
- Bulun, S.E. (2011). *Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis.* Elsevier. 581–660.
- Buttner, A., Thieme, D. (2010). Side effects of anabolic androgenic steroids: pathological findings and structure-activity relationships. *Handb. Exp. Pharmacol.* 195, 459–84.
- Carlini, E.L.A., Noto, A.R., Sanchez, Z.M., Carlini, C.M.A., Locatelli, D.P., Abeid, L.R., Amato, T.C., Opaleye, E.S., Tondowski, C.S., Moura, Y.G. (2010). VI Levantamento nacional sobre o consumo de drogas

psicotrópicas entre estudantes do Ensino Fundamental e Médio das redes pública e privada nas 27 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID, 506.

Carosio, S., Berardinelli, M.G., Aucello, M., Musar`o, A. (2011). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Research Reviews*. 10, 35–42.

Carr, M.C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 88, 2404–11.

Catlin, D.H., Murray, T.H. (1996). Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic sport. *JAMA*. 276, 231–7.

Cerretani, D., Neri, M., Cantatore, S., Ciallella, C., Riezzo, I., Turillazzi, E. et al. (2013). Looking for organ damages due to anabolic-androgenic steroids (aas): is oxidative stress the culprit? *Mini-Rev Org Chem*.10, 393–9.

Chesnut, III H., Ivey, J.L., Gruber, H.E., Matthews, M., Nelp, W.B., Sisom, K., et al. (1983). Stanozolol in postmenopausal osteoporosis: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Metabolism*. 32, 571–80.

Chrczcanowicz, J., Gawron, A., Zwolinska, A., Graft-johnson, J., Krajewski, W., Krol, M., Markowski, J., Kostka, T., Nowak, D. (2008). Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 46, 342–9.

Clark A. (2003). Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav. Ver.* 27, 413– 436.

Cohen, J.C., Hickman, R. (1987). Insulin resistance and diminished glucose tolerance in powerlifters ingesting anabolic steroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 64, 960–963.

Cohen, J.C., Noakes, T.D., Benade, A.J., (1988). Hypercholesterolemia in male power lifters using anabolic-androgenic steroids. *Phys. Sportsmed*. 16, 49–56.

Conway, A.J., Handelsman, D.J., Lording, D.W., Stuckey, B., Zajac, J.D. (2000). Use, misuse and abuse of androgens. *Med J Aust*. 172, 220–4.

Corrigan, B. (1999). Dehydroepiandrosterone and sport. *Med J Aust*.171, 206–8.

Cowart, V. (1987). Steroids in sports: after four decades, time to turn these genes to bottle? *JAMA*. 257, 421–7.

David, K., Dingemans, E., Freud, J., Laquer, E., (1935). Uber Krystallinisches mannliches Hormon Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin Bereitetes Androsteron. *Zeit. Physiol. Chem*. 233, 281–282.

De Lorenzi, D.R.S.; Danelon, C.; Saciloto, B.; Padilha, J.R. (2005). Fatores indicadores da sintomatologia climatérica. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 27, 12–19.

De Rose, E.H e Nóbrega, A.C.L. (1999). Drogas lícitas e ilícitas. *Atheneu*. 395–405.

Dekkers J. C., Van Doornen L. J. P., Kemper H. C. G. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine*. 21, 213–238.

- Della Torre, S., Benedusi, V., Fontana, R., Maggi, A. (2014). Energy metabolism and fertility—a balance preserved for female health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 13–23.
- Dirix, A., Knuttgen, H.E. e Titell, K. (1988). *Olympic book of sports medicine*. Blackwell.
- Do Carmo, C.A., Gonçalves, A.L., Salvadori, D.M., Maistro, E.L. (2012). Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J Appl. Toxicol.* 32, 810–814.
- DuRant, R.H., Escobedo, L.G., Heath, G.W. (1995). Anabolic–steroid use, strength training, and multiple drug use among adolescents in the United States. *Pediatrics.* 96, 23–28.
- Ebeling, P., Koivisto, V.A. (1994). Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet.* 343:1479–81.
- Elliot, D.L. e Goldberg, L. (2000). Women and anabolic steroids. *Anabolic Steroids in Sport and Exercise, Human Kinetics, Champaign.* 225–246.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics.* 82, 70–77.
- El-Moghazy, M., Tousson, E., Sakeran, M.I. (2012). Changes in the hepatic and renal structure and function after a growth promoter boldenone injection in rabbits. *Anim Biol-Leiden.* 62, 171.
- Engel, L.L., Alexander, J., Wheeler, M. (1958). Urinary metabolites of administered 19- nortestosterone. *J Biol.Chem.* 231, 159–165.
- Evans, N. (1997). Gymnastonic: Profile of 100 male steroidusers. *British Journal of Sports Medicine,* 31, 54–58.
- Evans, N.A. (2004). Current concepts in anabolic–androgenic steroids. *Am. J. Sports Med.* 32, 534–42.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 911–9.
- Feldman, E. (2004). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. *Animal Models of Diabetic Complications Consortium.* 1, 1–3.
- Ferenchick, G. (1991). Anabolic/androgenic steroid abuse and thrombosis: is there a connection? *Med Hypotheses.* 35, 27–31.
- Ferenchick, G., Schwartz, D., Ball, M., Schwartz, K. (1992). Androgenic–anabolic steroid abuse and platelet aggregation: a pilot study in weight lifters. *Am. J. Med. Sci.* 303, 78–82.
- Ferenchick, G.S. (1990). Are androgenic steroids thrombogenic? *N. Engl. J. Med.* 322, 476.
- Ferenchick, G.S., Adelman, S. (1992). Myocardial infarction associated with anabolic steroid use in a previously healthy 37-year-old weight lifter. *Am. Heart J.* 124, 507–508.
- Fernandes, C.E., Bacarat, E.C., Lima, G.R., editores. (2004). *Climatério: manual de orientação*. São Paulo: Ponto.
- Ferrer M, Encabo A, Marin J, Balfagon G. (1994). Chronic treatment with anabolic steroid, nandrolone, inhibits vasodilator responses in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 252, 233–241.
- Ferrera, P.C., Putnam, D.L. e Verdile, V.P. (1997). Anabolicsteroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology.* 88, 218–20.

- Finaud J., Lac G. e Filaire E. (2006). Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*. 36, 327–358.
- Fineschi, V., Di Paolo, M., Neri, M., Bello, S., D'Errico, S., Dinucci, D., et al. (2011). Anabolic steroid- and exercise-induced cardio-depressant cytokines and myocardial beta1 receptor expression in CD1 mice. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 275–284.
- Fischer, W.H., Keiwan, A., Schmitt, E., Stopper, H. (2001). Increased formations of micronuclei alter hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*. 16, 209–212.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. e Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology & Medwme*. 4, 155-16.
- Frankenfeld, S.P., Oliveira, L.P., Ortenzi, V.H., Rego-Monteiro, I.C., Chaves, E.A., Ferreira, A.C., et al. (2014). The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male wistar rats. *PLoS ONE*. 9.
- Frankle, M.A., Eichberg, R., Zachariah, S.B., (1988). Anabolic–androgenic steroids and a stroke in an athlete: case report. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 69, 632–633.
- Franquni, J.V.M., Nascimento, A.M., Lima, E.M., Brasil, G.A., Heringer, O.A., Cassaro, K.O.S., et al. (2013). Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold–Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids*. 78, 379–385.
- Freitas, C.B.D. (1997). Ética comum. *Medicina (CFM)*. 10, 6.
- Friedl, K.E. (2000). Effect of anabolic steroids on physical health. *Anabolic Steroids in Sport and Exercise*, second. *Human Kinetics*. 175–225.
- Frisoli, A. Jr., Chaves, P.H.M., Pinheiro, M.M., Szejnfeld, V.L. (2005). The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobina levels in elderly women with osteoporosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Gerontol A Bio Sci Med*.
- Gaillard, J.L. e Silberzahn, E. (1987). Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. *J BiolChem*. 262, 5717–5722.
- Gaspard, U. (2009). Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas*. 62, 362–5.
- Geary, N., Asarian, L., Sheahan, J., Langhans, W., (2004). Estradiol-mediated increases in the anorexia induced by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide in female rats. *Physiol. Behav.* 82, 251–261.
- Gerez, J.R., Frei, F. e Camargo I.C.C. (2005). Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception*. 72, 77–80.
- Glazer, G. (1991). Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. *Arch. Intern. Med.* 151, 1925–1933.
- Gold, J., High, H.A., LI, Y., et al. (1996). Safety and efficacy of nandrolone decanoate for treatment of wasting in patients with HIV infection. *AIDS*. 10, 745–752.

Goldberg, L., Mackinnon, D.P., Elliot, D.L., Moe, E.L., Clarke, G., Cheong, J. (2000). The adolescents training and learning to avoid steroids program: preventing drug use and promoting health behaviors. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 154, 332–8.

Goldwire, M.A., Price, K.O. (1995). Sports pharmacy: counseling athletes about banned drugs. *Am. Pharm.* 35, 24-30.

Gordan, G.S., Lowe, R.C., Carbone, J.V., et al. (1965). Methyltestosterone, related steroids, and liver function. *Arch. Intern. Med.* 116, 289–94.

Gragera, R., Saborido, A., Molano, F., Jimenez, L., Muñiz, E., Megias, A. (1993). Ultrastructural changes induced by anabolic steroids in liver of trained rats. *Histol. Histopathol.* 8, 449–55.

Grodstein, F., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Willett, W.C., Rosner, B. (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*; 335:453–61. 1996.

Gruber, A.J. e Pope, H.G. (2000). Psychiatric and medical effects of anabolic androgenic steroid use in women *Psychother. Psychosom*, 69, 19–26.

Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Merz, C.N., Brewer Jr., H.B., Clark, L.T., Hunninghake, D.B., Pasternak, R.C., Smith Jr., S.C., Stone, N.J. (2004). Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110, 227–239.

Gutowski, M. e Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 1–16.

Guzmán M, Saborido A, Castro J, Molano F, Megias A. (1991). Treatment with anabolic steroids increases the activity of the mitochondrial outer carnitine palmitoyltransferase in rat liver and fast-twitch muscle. *Biochem. Pharmacol.* 41, 833–5.

Hall, R.C., Hall, R.C. (2005). Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *South Med. J.* 98, 550–555.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology.* 141, 312–322.

Handelsman, D.J. (2001). Androgen action and pharmacologic uses. *Endocrinology.* 232–42.

Hardman, J.G., Gilman, A.G., Linbird, L.E. (1996). The pharmacologic basis of therapeutics.

Harlow, B.L., Wise, L.A., Otto, M.W., Soares, C.N., Cohen, L.S. (2003). Harvard study of moods and cycles. *Arch. Gen. Psychiatry.* 60, 29–36.

Hartgens, F. e Kuipers, H. (2004). Effects of androgenic–anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 34, 513–54.

Hartgens, F., Rietjens, G., Keizer, H.A., Kuipers, H., Wolffenbuttel, B.H. (2004). Effects of androgenic–anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein. *Br. J. Sports Med.* 38, 253–259.

Hassan, A.F. e Kamal, M.M. (2013). Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Int. J. Health Sci.* 7, 47–60.

Haupt, H.A., Rovere, G.D., (1984). Anabolic steroids: a review of the literature. *Am. J. Sports Med.* 12, 469–484.

Hengge, U.R., Stocks, K., Faulkner, S., Wiehler, H., Lorenz, C., Jentzen, W., et al. (2002). Oxymetholone for the treatment of hiv-wasting: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial in eugonadal men and women. *HIV Clin. Trials*. 4, 150–63.

Hirschberg, A.L. (2012). Sex hormones, appetite and eating behavior in women. *Maturitas*. 71, 248–256.

Hoberman, J.M. e Yesalis, C.E. (1995). The history of synthetic testosterone. *Sci Am*. 272:60–5.

Hong, J., Stubbins, R.E., Smith, R.R., Harvey, A.E., Nunez, N.P. (2009). Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr. J.* 8, 11.

Hulley, S. et al. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women - HERS Study. *JAMA*. 280, 605–613.

Hurh, Y.J.; Chen, Z.H.; Na, H.K.; Han, S.Y.; Surh, Y.J. 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health*. 67:1939–1953. 2004.

Iriart, J.A.B. e Andrade, T.M. (2002). Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 18, 1379–1387.

Johansen, K.L., Mulligan, K., Schambelan, M. (1999). Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis: A randomized controlled trial. *JAMA*. 281, 1275–1281.

Johnston, L.D., O'malley, P.M., Bachman, J.G., Schulenberg, J.E. (2008). Monitoring the Future: National Results on Adolescent Drug Use: Overview of Key Findings, 2007. National Institutes of Health.

Josefson, D., e Latest, H.R.T. (2003). Trial results show risk of dementia. *BMJ*. 326, 1232.

Juhn, M. (2003). Popular sports supplements and ergogenic aids. *Sports Med* 33, 921–939.

Kaaja, R.J. (2008). Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int*. 14, 21–25.

Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.M. (2001). The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 95–114.

Kai, H., Muraishi, A., Sugiu, Y., Nishi, H., Seki, Y., Kuwahara, F., Kimura, A., Kato, H., Imaizumi, T. (1998). Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res*. 83, 594–601.

Karila, T.A., Karjalainen, J.E., Mantysaari, M.J., Viitasalo, M.T., Seppala, T.A. (2003). Anabolic–androgenic steroids produce dose-dependant increase in left ventricular mass in power athletes, and this effect is potentiated by concomitant use of growth hormone. *Int. J. Sports Med*. 24, 337–343.

Kaume, L., Gilbert, W.C., Brownmiller, C., Howard, L.R., Devareddy, L. (2012). Cyanidin 3-O- β -d-glucoside-rich blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats. *Journal of Functional Foods*. 4, 480–8.

Kim, J.S., Park, Y.M., Lee, S.R., et al. (2012). β -Hydroxy- β -methylbutyrate did not enhance high intensity resistance training-induced improvements in myofiber dimensions and myogenic capacity in aged female rats. *Molecules and Cells*. 34, 439–448.

Kim, M.J., Park, J.H., Kwon, D.Y., Yang, H.J., Kim, da S., Kang, S., et al. (2015). The supplementation of Korean mistletoe water extracts reduces hot flushes, dyslipidemia, hepatic steatosis, and muscle loss in ovariectomized rats. *Exp. Biol. Med*. 240, 477– 87.

- Kopera, H. (1985). The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta Endocrinol. Suppl.* 271, 11–18.
- Korkia, P. e Stimson, G. V. (1997). Indication of prevalence, practice and effects of anabolic steroid use in Great Britain. *International Journal of Sports Medicine.* 18, 557–562.
- Kouri, E.M., Pope Jr., H.G., Oliva, P.S. (1996). Changes in lipoprotein-lipid levels in normal men following administration of increasing doses of testosterone cypionate. *Clin. J. Sport Med.* 6, 152–157.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/ life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev. Physiol.* 60, 619–642.
- Kuhn, C.M. (2002). Anabolic steroids. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 411–434.
- Kuipers, H., Wijnen, J., Hartgens, F., Willems, S. (1991). Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int. J. Sports Med.* 12, 413–8.
- Lajarin, F., Zaragoza, R., Tovar, I., Martinez-Hernandez, P. (1996). Evolution of serum lipids in two male bodybuilders using anabolic steroids. *Clin. Chem.* 42, 970–972.
- Lane, H., Grace, F., Smith, J.C., Morris, K., Cockcroft, J., Scanlon, M.F., Davies, J.S. (2006). Impaired vaso reactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *Eur. J. Clin. Invest.* 36, 483–488.
- Lenders, J.W., Demacker, P.N., Vos, J.A., Jansen, P.L., Hoitsma, A.J., van 't Laar, A., Thien, T. (1988). Deleterious effects of anabolic steroids on serum lipoproteins, blood pressure, and liver function in amateur body builders. *Int. J. Sports Med.* 9, 19–23.
- Lieberherr, M. e Grosse, B. (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol. Chem.* 269, 7217–7223.
- Lin, H., Lu, J., Laflamme, P, Qiao, S., Shayegan, B., Bryskin, I., Monardo, L., Wilson, B.C., Singh, G., Pinthus, J.H. (2010). Inter-related in vitro effects of androgens, fatty acids and oxidative stress in prostate cancer: A mechanistic model supporting prevention strategies. *International Journal of Oncology.* 37: 761–766.
- Lin, Y. et al. (2005). The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 280, 4617–4626.
- Lise, M.L.Z., Gama-e-Silva, T.S., Ferigolo, M. e Barros, H.M.T. (1999). O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 45,1–11.
- Litwack, G. e Schmidt, T.J. (1997). *Biochemistry of hormones II: steroids hormones. Textbook of biochemistry with clinical correlations.* 893–918.
- Lobo, R.A. (2004). Evaluation of cardiovascular event rates with hormone therapy in healthy, early postmenopausal women. *Arch. Intern. med.* 164, 482–4.
- Ludgero-Correia Jr., A. Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Faria, T.S. (2012). Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition.* 28, 316–323.
- Lukas, S.E. (1993). Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *TIPS.* 14, 61-8.

- Mackedanz, V., Mattos, C.B., Feksa, L.R., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T. (2011). Ovariectomy alters energy metabolism in rat striatum: effect of supplementation with soy diet rich in isoflavones. *Metab Brain Dis.* 26, 97–105.
- Maclennan, A., Lester, S., Moore, V. (2004). Oral oestrogen replacement therapy versus placebo for hot flushes. *The Cochrane Library.*
- Maltais, M.L., Desroches, J., Dionne, I.J. (2009). Changes in muscle mass and strength after menopause. *Journal of Musculo skeletal Neuronal Interactions.* 9, 186–197.
- Mannella, A. (2008). Structural diversity of mitochondria. *Ann N Y Acad. Sci.* 1147, 171–9.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. e Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62 609-614.
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2685–700.
- Marquardt, G.H., Logan, C.E., Tomhave, W.G., Dowben, R.M. (1964). Failure of non-17-alkylated anabolic steroids to produce abnormal liver function tests. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 24, 1334–6.
- McGarry, J.D., Brown, N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system from concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1–14.
- McKillop, G. e Ballantyne, D. (1987). Lipoprotein analysis in bodybuilders. *Int. J. Cardiol.* 17, 281–288.
- Melchert, R.B. e Welder, A.A. (1995). Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids, *Med. Sci. Sports Exerc.* 27, 1252–1262.
- Melo, J.M.S. (1997). *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas.*
- Mesquita, C.S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J.V., Marcos, J.C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry.* 458, 69–71.
- Mesquita, C.S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J.V., Marcos, J.C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry.* 458, 69–71.
- Metcalf, M. G. e Livesey, J. H. (1985). Gonadotrophin excretion in fertile women: effect of age and the onset of the menopausal transition. *J. Endocr.* 105, 357-362.
- Metcalf, D., Watts, E., Masters, J.P., Smith, N. (2012). Anabolic steroids in patients undergoing total knee arthroplasty. *B.M.J. Open.* 22, 2.
- Middleman, A.B., Faulkner, N.A., Woods, E.R., Emans, S.J., Durant, R.H. (1995). High risk behaviors among high school students in Massachusetts who use anabolic steroids. *Pediatrics.* 96, 268-72.
- Misra, H.P. e Fridovich, I. (The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry.* 247(10): 3170-5. 1972.
- Misso, M. L. et al. (2005). Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition. *Maturitas* 51, 299–306.

Mochizuki, R.M., Richter, K.J. (1988). Cardiomyopathy and cerebrovascular accident associated with anabolic-androgenic steroid use. *Phys. Sportsmed.* 16, 109–114.

Morón, Ú.M. e Castilla-Cortázar, I. (2012). Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions”.

Mota, V.G., Pamplona, M.S., Albuquerque, A. editores. (2008). Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa. Brasília : Editora do Ministério da Saúde.

Nas mulheres obesas, principalmente naquelas com resistência à insulina, há uma diminuição na produção da globulina carreadora dos hormônios esteróides (SHBG), com uma maior quantidade de androgênios livres, que são transformados periféricamente em estrogênios.

Nelson, H.D., Humphrey, L.L., Nygren, P., Teutsch, S.M., Allan, J.D. (2002). Postmenopausal hormone replacement: scientific review. *JAMA.* 288, 872–81.

NIDA (The National Institute on Drug Abuse), Research Report Series. Anabolic Steroids Abuse. Washington, DC: NIDA. 2001.

Nilson, S. (1995). Androgenic anabolic steroid use among male adolescents in Falkenberg. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 48, 9–11.

O'Connor, J.S., Baldini, F.D., Skinner, J.S., Einstein, M. (1990). Blood chemistry of current and previous anabolic steroid users. *Mil Med*; 155, 72–5.

O'Sullivan, A.J., Kennedy, M.C., Casey, J.H., Day, R.O., Corrigan, B., Wodak, A.D. (2000). Anabolic–androgenic steroids: medical assessment of present, past and potential users. *Med. J. Aust.* 173, 232–7.

Oner, H. e Ozan, E. (2002). Effects of gonadal hormones on thymus gland after bilateral ovariectomy and orchidectomy in rats. *Arch Androl.* 48, 115–26.

Oppermann-Lisbôa, K. e Wannmacher, L. (2001). Reposição hormonal na menopausa: benefícios e riscos. *Reprodução e Climatério.* 16, 11–19.

Pacifici, R. (1996). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner Res.* 11, 1043–51.

Pacifici, R., Brown, C., Puscheck, E., Friedrich, E., Slatopolsky, E., Maggio, D., et al. (1991). Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 5134–8.

Paganini-Hill, A., Henderson, V.W. (1994). Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am. J. Epidemiol.* 140, 256–61.

Pagonis, T.A., Koukoulis, G.N., Hadjichristodoulou, C.S., Toli, P.N., Angelopoulos, N.V. (2008). Multivitamins and phospholipids complex protects the hepatic cells from androgenic-anabolic-steroids-induced toxicity. *Clin. Toxicol.* 46, 57–66.

Palatini, P., Giada, F., Garavelli, G., Sinisi, F., Mario, L., Michieletto, M., Baldo-Enzi, G. (1996). Cardiovascular effects of anabolic steroids in weighttrained subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 1132–1140.

Pardini, D. (2007). Terapia Hormonal da Menopausa. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 51, 938–942.

- Park, Y.W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M.R., Heymsfield, S.B. (2011) The Metabolic Syndrome: Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.*
- Parker, W.H., Broder, M.S., Chang, E., Feskanich, D., Farquhar, C., Liu, Z., Shoupe, D., Berek, J.S., Hankinson, S., Manson, J.E. (2009). Ovarian conservation at the time of hysterectomy and long-term health outcomes in the nurses' health study. *Obstet. Gynecol.* 113, 1027–1037.
- Parkinson, A. e Evans, N.A. (2006). Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Med. Sci. Sport Exer.* 38, 644–651.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T, Georgiou, C. D., Angelatou, F., Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters.* 357, 83–86.
- Perry, H.M., Wright, D. e Littlepage, B.N. (1992). Dying to the big: A review of anabolic steroid use. *British Journal of Sports Medicine.* 26, 259–261.
- Perry, P.J., Lund, B.C., Deninger, M.J., Kutscher, E.C., Schneider, J. (2005). Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey of drug utilization. *Clin. J. Sport Med.* 15, 326–330.
- Pey, A., Saborido, A., Blázquez, I., Delgado, J., Megíaas, A. (2003). Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein hsp72 levels in rat liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 269–77.
- Pfeilschifter, J., Koditz, R., Pfohl, M., Schatz, H. (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.* 23, 90–119.
- Pinthus, J. H., Bryskin, I., Trachtenberg, J., Luz, J.-P., Singh, G., Fridman, E., Wilson, B. C. (2007b). Androgen induces adaptation to oxidative stress in prostate cancer: implications for treatment with radiation therapy. *Neoplasia.* 9: 68–80.
- Pinthus, J.H., Lu, J.P., Bidaisee, L.A., et al. (2007). Androgen-dependent regulation of medium and long chain fatty acids uptake in prostate cancer. *Prostate.* 67: 1330–1338.
- Poehlman, E.T. (2002). Menopause, energy expenditure, and body composition. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 81, 603-11.
- Poehlman, E.T. e Tchernof, A. (1998). Transversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. *Coron. Artery Dis.* 9, 799–803.
- Polotsky, H.N. e Polotsky, A.J. (2010). Metabolic implications of menopause. *Seminars in reproductive medicine.* 28, 426–34.
- Pope, H.G. e Brower, K.J. (2010). Anabolic-androgenic steroidrelated disorders. *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry.*
- Pozzi, R., Fernandes, K.R., Moura, C.F.G., Ferrari, R.A.M., Fernandes, K.P.S, Renno, A.C.M., Ribeiro, D.A. (2013). Nandrolone Decanoate Induces Genetic Damage in Multiple Organs of Rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 514–518.
- Ramos, D., Martins, E.G., Viana-Gomes, D., Casimiro Lopes, G., Salerno, V.P. (2013). Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* 38, 1–5.

- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (1997). *Farmacologia*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rashid, H., Osmerod, S., Day, E. (2007). Anabolic–androgenic steroids: what the psychiatrist needs to know. *Adv. Psychiatr. Treat.* 13, 203–211.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*. 49, 1603–1616.
- Rich, J.D., Dickinson, B.P., Feller, A., Pugatch, D., Mylonakis, E. (1999). The infectious complications of anabolic-androgenic steroids injection. *International Journal of Sports Medicine*, 20:563–566.
- Riezzo, I., Turillazzi, E., Bello, S., Cantatore, S., Cerretani, D., Dipaolo, M. et al. (2014). Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF- α mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 97–106.
- Rogers, N.H., Perfield, J.W., Strissel, K.J., Obin, M.S., Greenberg, A.S. (2009). Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 50, 2161–8.
- Rosano, G.M., Cornoldi, A., Fini, M. (2005). Effects of androgens on the cardiovascular system. *J. Endocrinol Invest.* 28, 32–38.
- Rosano, G.M., Vitale, C., Marazzi, G., Volterrani, M. (2007). Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric*. 10, 19–24.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288: 321-33.
- Ryou, S.H., Kang, M.S., Kim, K.I., Kang, Y.H., Kang, J.S. (2012). Effects of green tea or *Sasa quelpaertensis* bamboo leaves on plasma and liver lipids, erythrocyte Na efflux, and platelet aggregation in ovariectomized rats. *Nutr Res Pract.* 6, 106-12.
- Sader, M.A., Griffiths, K.A., McCredie, R.J., Handelsman, D.J., Celermajer, D.S. (2001). Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37, 224–230.
- Sale, G.E. e Lerner, K.G. (1977). Multiple tumors after androgen therapy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 101, 600–3.
- Sanchez-Medal, L., Gomez-Leal, A., Duarte, L., Rico, M.G. (1969). Anabolic androgenic steroids in the treatment of acquired aplastic anemia. *Blood*. 34, 289–300.
- Santoro, N.F., Clarkson, T.B., Freedman, R.R. (2004). Treatment of menopause-associated vasomotor symptoms: position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, 11, 11-33.
- Schumacher, J., Muller, G. e Klotz, K. (1999). Large hepatic hematoma and intra abdominal hemorrhage associated with abuse of anabolic steroids. *N. Engl. J. Med.* 340,1123–4.
- Scott, D.M., Wagner, C.J. e Barlow, T.W. (1996). Anabolic steroid use among adolescents in Nebraska schools. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 53, 2068–2072.
- See, K.L., See, M., Glud, C. (1992). Liver pathology associated with the use of anabolic androgenic steroids. *Liver*. 12, 73–9.

- Shahidi, N.T. (2001). A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.* 23, 1355–1390
- Shifren, J.L. (2004). The role of androgens in female sexual dysfunction. *Mayo Clin. Proc.* 79, S19–S24.
- Shoupe, D., Parker, W.H., Broder, M.S., Liu, Z., Farquhar, C., Berc, J.S. (2007). Elective oophorectomy for benign gynecological disorders. *Menopause* 14, 580–585.
- Shumaker, S., Legault, C., Rapp, S., Thal, L., Wallace, R., Robert, B. (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: The Women's Health Initiative memory study: A randomized controlled trial. *JAMA.* 289, 2651–62.
- Shumaker, S.A., Reboussin, B.A., Espeland, M.A., Rapp, S.R., McBee, W.L., Dailey, M. (1998). The Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS): a trial of the effect of estrogen therapy in preventing and slowing the progression of dementia. *Control Clin. Trials.* 19, 604–21.
- Sid, B., Verrax, J., Calderon, P. (2013). Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radical Res.* 47, 894–904.
- Sies, H. et al. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. *Oxid Stress.* 1–8.
- Silva, L.S.M.F e Moreau, R.L.M. (2003). Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 39
- Silva, P.R., Machado, L.-C.J., Figueiredo, V.C., Cioffi, A.P., Prestes, M.C., Czepielewski, M.A. (2007). Prevalence of the use of anabolic agents among strength training apprentices in Porto Alegre, RS. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51, 104–110.
- Silva, P.R.P., Danielski, R., Czepielewski, M.A. (2002). Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 8.
- Sites, C.K., Toth, M.J., Cushman, M., L'Hommedieu, G.D., Tchernof, A., Tracy, R.P., et al. (2002). Menopause-related differences in inflammation markers and their relationship to body fat distribution and insulin-stimulated glucose disposal. *Fertility and Sterility.* 77, 128–35.
- Sjoqvist, F., Garle, M. e Rane, A. (2008). Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet*; 371, 1872-82.
- Snyder, P.J., (2001). Androgens. In: Hardman Limbird, J.G.L.E., Goodman Gilman, A. (Eds.), *The pharmacological Basis of Therapeutics*, tenth ed. McGraw Hill, 1635–1648.
- Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. (1989). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 134–55.
- Stimac, D., Milic, S., Dintinjana, R.D., Kovac, D., Ristic, S. (2002). Androgenic/anabolic steroid-induced toxic hepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 35, 350–2.
- Strauss, R.H., Liggett, M.T., Lanese, R.R. (1985). Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes. *JAMA.* 253:2871–3.
- Su, T., Pagliaro, M., Schmidt, P.J., Pickar, D., Wolkowitz, O., Rubinow, D.R. (1993). Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. *JAMA.* 269, 2760–4.

- Suganami, T. et al. (2007). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 84–91.
- Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B. (1996). Effect of estrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer disease. *Lancet.* 348, 429–32.
- Tanno, A.P., Neves, V.J., Rosa, K.T., Cunha, T.S., Giordano, F.C.L., Calil, C.M., et al. (2011). Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci.* 89, 631–637.
- Thein, L.A., Thein, J.M., Landry, G.L. (1995). Ergogenic aids. *Phys. Ther.* 75, 426–38.
- Thiblin, I. e Petersson, A. (2005). Pharmacology of anabolic androgenic steroids: a review *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 27–44.
- Thompson, P.D., Cullinane, E.M., Sady, S.P., Chenevert, C., Saritelli, A.L., Sady, M.A., Herbert, P.N. (1989). Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *JAMA.* 261, 1165–1168.
- Togna, G.I., Togna, A.R., Graziani, M., Franconi, M. (2003). Testosterone and cocaine: vascular toxicity of their concomitant abuse. *Thromb. Res.* 109, 195–201.
- Toth, M.J., Tchernof, A., Sites, C.K. e Poehlman, E.T. (2000). Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci.* 904, 502–6.
- Tseng, Y.T., Rockhold, R.W., Hoskins, B., HO, I.K. (1994). Cardiovascular toxicities of nandrolone and cocaine in spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22, 113–121.
- Turani H, Levi J, Zevin D, Kessler E. (1983). Hepatic lesions in patients on anabolic androgenic therapy. *Isr. J. Med. Sci.* 19, 332–7.
- Urhausen, A., Albers, T., Kindermann, W., 2004. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart* 90, 496–501.
- Urhausen, A., Torsten, A., Wilfried, K. (2003). Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic androgenic steroid abusers. *J. Steroid. Biochem.* 84, 369–375.
- Urtado, C.B., Pereira, G.B., Urtado, M.B., Carvalho, E.B., Leite, G.S., Donatto, F.F., Assumpção, C.O., Leite, R.D., Silva, C.A., Sales, M.M., Tibana, R.A., Alves, S.C.C., Prestes, J. (2011). Resistance training associated with the administration of anabolic-androgenic steroids improves insulin sensitivity in ovariectomized rats. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 4, 385–391.
- Velazquez, J. e Alter, B.P. (2004). Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am. J. Hematol.* 77, 257–67.
- Villa, A., Della Torre, S., Stella, A., Cook, J., Brown, M., e Maggia, A. (2012). Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition. *Proc. Natl Acad. Sci.* 109, 11806–11811.
- Weidemann, W. e Hanke, H. (2002). Cardiovascular effects of androgens. *Cardiovasc Drug Rev.* 20, 175–98.
- Weisberg, S. P. et al. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.

- Welder, A.A., Robertson, J.W. e Melchert, R.B. (1995). Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 33, 187–95.
- Wettstein, A. (1935). Über die kunstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron. *Schweiz Med. Wochenschr.* 16, 912.
- Wilds, A.L. e Nelson, N.A. (1953). The facile synthesis of 19-nortestosterone and 19-norandrostendione from estrone. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5366-5369.
- Wilson, J.D. (1992). Androgens. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, vol. 8. McGraw-Hill Inc. 1413–1462.
- Wilson, J.D. (1996). Androgens. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. Singapore, McGraw-Hill Book Co. 1441-57.
- Wluka, A.E., Cicuttini, F.M., Spector, T.D. (2000). Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas.* 35, 183–99.
- Wynne, F., Khalil, R.A. (2003). Testosterone and coronary vascular tone: implications in coronary artery disease. *J. Endocrinol. Invest.* 26, 181–186.
- Xu, H. et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- Xu, P., Dai, S., Wang, J., Zhang, J., Liu, J., Wang, F., Zhai, Y. (2016). Preventive obesity agent montmorillonite adsorbs dietary lipids and enhances lipid excretion from the digestive tract. *Sci. Rep.* 6, 19659.
- Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., Grady, D. (1998). Estrogen Therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA.* 279, 688–95.
- Yesalis, C.E., Kennedy, J.C., Kopstein, N.A. e Bahrke, M.S. (1993). Anabolic-androgenic steroid use in the United States. *JAMA,* 270, 1217–1221.
- You, T., Ryan, A.S., Nicklas, B.J. (2004). The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5517–5522.
- Zaugg, M., Jamali, N.Z., Lucchinetti, E., Xu, W., Alam, M., Shafiq, S.A., Siddiqui, M.A. (2001). Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J. Cell Physiol.* 187, 90–95.
- Zhang, H., Liu, Y., Wang, L., Li, Z., Zhang, H., Wu, J., et al. (2013). Differential effects of estrogen/androgen on the prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the male rat. *J. Lipid Res.* 54, 345–57.
- Zuliani, U., Bernardini, B., Catapano, A., Campana, M., Cerioli, G., Spattini, M. (1989). Effects of anabolic steroids, testosterone, and HGH on blood lipids and echocardiographic parameters in body builders. *Int. J. Sports Med.* 10, 62– 66.
- Zweifel, J.E. e O'Brien, W.H. (1997). A meta-analysis of the effect of hormone replacement therapy upon depressed mood. *Psychoneuroendocrinology.* 22, 189-212.