



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE NANDROLONA E METOPROLOL
SOBRE O SISTEMA MUSCULAR E REPRODUTIVO DE RATOS**

Aluno: Leonardo Bruno Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti


UBERLÂNDIA-MG

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE NANDROLONA E METOPROLOL
SOBRE O SISTEMA MUSCULAR E REPRODUTIVO DE RATOS**

ALUNO: Leonardo Bruno Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA-MG

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F475e Figueiredo, Leonardo Bruno, 1983-
Efeito da associação de Nandrolona e Metoprolol sobre o sistema muscular e reprodutivo de ratos / Leonardo Bruno Figueiredo. - 2009. 96 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Co-orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.


Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Histologia - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Beletti, Marcelo Emílio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 576.3

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras-chave: esteróides anabolizantes, β -bloqueadores, morfometria, aparelho reprodutor, músculo estriado esquelético, ratos.

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE NANDROLONA E METOPROLOL
SOBRE O SISTEMA MUSCULAR E REPRODUTIVO DE RATOS

ALUNO: LEONARDO BRUNO FIGUEIREDO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espíndola (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Luíz Borges Bispo da Silva
Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Data da Defesa: 05/06/2009.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

UBERLÂNDIA-MG
2009

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião Abadio de Figueiredo e Vera Lúcia Silva Figueiredo que, em nenhum momento, mediram esforços para conduzir seus filhos ao estudo, ensinando o melhor caminho a ser seguido, sem, no entanto, transpor as amizades e o respeito. Esta é uma pequena dedicatória perto de todo o esforço, amor e carinho que desprenderam em todos estes anos, para que hoje e sempre, seus filhos baseiem suas vidas em Deus”.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me gerado a vida e aprendizado, pois sem ele nada neste mundo é concebido. A verdade, amor, família e a paz estão em Deus. Muito Obrigado!

Aos Anjos e Santos que me auxiliam nesta caminhada.

Aos meus pais, Sebastião Abadio de Figueiredo e Vera Lúcia Silva Figueiredo, pelo carinho, atenção e apoio as minhas iniciativas e sonhos assim como à minha irmã, Vanessa Figueiredo.

Agradeço à minha namorada Carolina da Rocha Cortes por todo o seu amor, carinho, amizade, incentivo, paciência e dedicação nas horas de alegria e sofrimento, fazendo com que nosso namoro seja sólido, sustentado e guiado pelas palavras de Deus que sempre serviram de incentivo e apoio a mim em todos os momentos da vida acadêmica e pessoal. Espero que Deus continue abençoando nossas vidas, e que sempre possamos permanecer unidos.

Aos meus tios, tias, primos, primas e tantos outros familiares que sempre apóiam a minha caminhada, incentivando meus esforços através de estímulos, afeto e tantas outras coisas que me impulsionam a buscar sempre mais.

Este trabalho, inicialmente pelos seus fins, é considerado individual, mas aqui não poderia deixar de lembrar e agradecer a todas as pessoas envolvidas, grandes colaboradores que direta ou indiretamente, contribuíram para que este objetivo fosse concretizado. Agradeço aos membros dos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) e aos do laboratório de Bioquímica do Exercício e Saúde (LABES), companheiros de jornada (Miguel Maurício Diaz Gomez, Rosilene Reis, Romualdo Morandi Filho, Danilo, Thiago Xavier, Mariana Nascimento, Luciana Karen Calábria, Alice Vieira da Costa, Vanessa de Oliveira, Ana Flávia, Neire Moura de Gouveia, Fabiana, Fernanda, Letícia, Lyvia, Simone

Deconte, Tatiane Vanessa, Renato, Leonardo Gomes Peixoto, Decivaldo Dias), aos membros do laboratório de Histologia (ICBIM) e a todos os outros que não estão mais presentes, mas que contribuíram significativamente em todas as horas que necessitei. Gostaria de dizer-lhe que juntos, formamos uma grande família.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, que confiou em minha capacidade e nos frutos deste projeto, sempre transmitindo com extrema dedicação e profissionalismo seu conhecimento científico. Estes dois anos foram de grande valia à minha formação científica e pessoal e isto jamais será esquecido. Agradeço por todo o ensino, ajuda, pelo tempo disponibilizado e por acreditar em mim e nos meus propósitos.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que além de professor é meu grande amigo, que em todos os momentos dentro da Universidade, me apoiou e quando os problemas me alcançaram estive presente sempre com incentivo para que me levantasse e continuasse o meu trabalho. Sou imensamente grato por todo o auxílio que me concedeu. Também lhe agradeço pelo seu empenho em orientar todos os seus orientandos de forma particular, assim, também me considero seu orientado, agradeço pela sua compreensão e vontade de ensinar, mostrando sempre “algo a mais” daquilo que estamos treinados a enxergar. Sempre serei grato. Um grande Obrigado!

Agradeço aos grandes parceiros de trabalho Miguel Maurício Diaz Gomez e Daniel Paulino Venâncio grandes colegas de trabalho que sempre me auxiliaram em meus trabalhos e perspectivas.

Aos técnicos de laboratório e aos residentes, Ismair Teodoro, Fabrício, Rui Reis, Richard, Renata, Débora e a todos os outros que sempre estiveram envolvidos nas pesquisas e colaborações e que me ajudaram muito no desenvolvimento do presente estudo.

Agradeço aos Professores: Prof. Dr. Antônio Vicente Mundim e Prof. Dr. Elmiro Santos Resende, pela amizade, orientações, colaborações, auxílios intelectuais e financeiros e troca de conhecimentos.

Agradeço a todos os outros professores que me auxiliaram e me guiaram em meu caminho durante minhas trajetórias em busca do conhecimento e de novas perspectivas (Prof. Esp. Antonio Andrade Nobile, Prof. Dra. Maeli Dal Pai Silva – UNESP/UNICAMP, Prof. Dra. Rosely Godinho - UNIFESP, Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira – USP, Prof. Dra. Patrícia Chakur Brum), que participando positivamente, na minha formação científica durante estes dois anos de mestrado.

Aos meus tantos amigos e tantos outros colegas que mesmo de longe me apoiaram. Obrigado pela amizade, compreensão, colaboração e respeito.

Muito Obrigado!

Índice

Apresentação	xiv
Capítulo I	1
Fundamentação teórica	2
Referências	8
Capítulo II	17
Página de Título	18
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Materiais e Métodos	22
Drogas	22
Grupos Experimentais	22
Design experimental e coleta das amostras	23
Imunohistoquímica	24
Análises morfométricas em microscopia de luz	25
Dosagens bioquímicas	26
Análises estatísticas	27
Resultados	27
Mensurações de parâmetros físicos e biométricos	27
Estudo morfológico e imunohistoquímica	28
Testosterona sérica total e dosagens bioquímicas nos músculos esqueléticos	31
Dados morfométricos	32

Discussão.....	36
Agradecimentos.....	45
Referências.....	45
Capítulo III	55
Página de Título.....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Resultados.....	58
Mensurações de parâmetros físicos e biométricos.....	60
Qualidade espermática.....	61
Análise Testicular.....	63
Testosterona total sérica.....	64
Discussão.....	65
Materiais e Métodos.....	70
Ética.....	70
Drogas e químicos.....	71
Grupos Experimentais.....	71
Tratamentos.....	71
Condições ambientais de confinamento e nutrição dos animais.....	72
Procedimento anestésico e eutanásia.....	72
Qualidade Espermática.....	72
Contagem, motilidade e vigor dos espermatozóides.....	73
Análises morfométricas dos espermatozóides.....	73
Análise testicular.....	74
Análises de testosterona sérica.....	75

Dosagem de proteína total, glutamina e glutamato	75
Análises estatísticas	76
Financiamento	76
Agradecimentos.....	76
Referências.....	76

Lista de figuras do Capítulo II

Figura 1. Secções seriais (5µm) de gastrocnêmio de animais controle, tratados com metoprolol, nandrolona e associação de nandrolona com metoprolol.....	37
--	----

Lista de tabelas do Capítulo II

Tabela 1: Parâmetros biométricos dos animais controle e submetidos ao tratamento com metoprolol, nandrolona e associação de metoprolol e nandrolona.....	35
Tabela 2: Concentrações de testosterona total sérica, proteína total, glutamato e glutamina nos músculos esqueléticos (sóleo, gastrocnêmio) e cardíaco (ventrículo esquerdo).....	38
Tabela 3: Parâmetros morfométricos analisados nos músculos estriados de ratos Wistar tratados ou não com metoprolol, nandrolona e com a associação de metoprolol e nandrolona.....	41

Lista de figuras Capítulo III

Figura 1: Análise da área, diferença percentual (condensação de cromatina) e coeficiente de variação (estrutura morfológica) (média ±desvio-padrão da média) das cabeças dos espermatozóides de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e a sua associação ($^{\circ}P < 0,0001$).....	68
Figura 2: Concentração (média±desvio-padrão da média) de testosterona total sérica de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e sua associação durante sete semanas. Níveis de testosterona apresentados em ng/dL mensurados por análise de quimioluminescência imunométrica ($^{\circ}P = 0,0003$).....	70

Lista de tabelas do Capítulo III

- Tabela 1:** Dados biométricos de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e associação de metoprolol e nandrolona.....66
- Tabela 2:** Parâmetros morfológicos dos espermatozoides de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e da associação entre metoprolol e nandrolona.....67
- Tabela 3:** Parâmetros biométricos, morfométricos e bioquímicos testiculares de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e com a associação entre metoprolol e nandrolona.....69

Apresentação

Esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são análogos sintéticos ao hormônio sexual testosterona que aumentam a síntese protéica e o crescimento celular em diferentes tecidos. Os EAA podem alterar a função e a estrutura muscular por ocasionarem aumento da área de secção transversa (AST) e do diâmetro de fibras musculares, que em última instância, geram hipertrofia nos músculos estriados, cardíaco e esquelético. No músculo cardíaco, o uso de EAA acarreta uma maior massa ventricular esquerda e um aumento da densidade septal interventricular. Os aumentos contínuos no tamanho do coração e na pressão sanguínea resultam em hipertrofia concêntrica compensatória na parede ventricular esquerda por aumento da densidade desta parede e diminuição da densidade diastólica. No músculo estriado esquelético, estes efeitos hipertróficos são acompanhados por mudanças em células satélites como também no número e localização de mionúcleos além de aumento de fibras em *splitting* e de fibrose. Entretanto, o abuso provocado por doses suprafisiológicas de EAA tem sido associado a efeitos colaterais no sistema reprodutor como atrofia testicular e espermatogênese prejudicada.

O tartarato de metoprolol, um bloqueador de receptor adrenérgico β 1-seletivo, é utilizado na prevenção secundária de infarto do miocárdio, como anti-hipertensivo e no tratamento de arritmias e hipertrofia cardíaca. O metoprolol melhora a função do ventrículo esquerdo (sístole e diástole) por atenuar a hipertrofia, reduzir a fibrose intersticial e aumentar a densidade capilar. Ainda que, anti-hipertensivos possam causar deficiência significativa na função testicular, ocasionando infertilidade, agentes cardioseletivos como atenolol e metoprolol apresentam menores efeitos deletérios na função sexual.

Para elucidar a hipótese de que o tartarato de metoprolol reduziria a hipertrofia muscular ocasionada pelo decanoato de nandrolona, o presente estudo investigou os efeitos da associação destas duas drogas sobre a musculatura estriada em modelo experimental tal como descrito no **capítulo 2**.

Considerando os efeitos colaterais ocasionados por cada uma das drogas administrada isoladamente no sistema reprodutor, buscou-se no **capítulo 3**, avaliar a consequência da associação de decanoato de nandrolona e tartarato de metoprolol nos espermatozoides e testículos de ratos com enfoque nas alterações dos parâmetros morfológicos e dos níveis de testosterona sérica e das concentrações testicular de proteína total, glutamato e glutamina.

Esta dissertação de mestrado é composta por três capítulos descritos conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (PGGB) da Universidade Federal de Uberlândia. É apresentada no primeiro capítulo uma fundamentação teórica do tema proposto o qual é trabalhado nos demais capítulos. O segundo refere aos efeitos da associação do decanoato de nandrolona e do metoprolol sobre a musculatura estriada de ratos Wistar e está de acordo com a revista *Histochemistry and Cell Biology* (<http://www.springer.com/medicine/anatomie/journal/418>). O terceiro capítulo menciona os efeitos da associação do decanoato de nandrolona e do metoprolol sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar e está de acordo com a revista *Reproduction* (<http://www.reproduction-online.org>).

Capítulo I

Fundamentação teórica

**Aspectos Fisiológicos e Farmacologia dos Esteróides
Anabolizantes Androgênicos e dos antagonistas
seletivos de receptor β_1 -adrenérgico: efeitos sobre a
musculatura estriada e sistema reprodutor**

Fundamentação teórica

Esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são análogos sintéticos do hormônio sexual testosterona os quais aumentam a síntese protéica e o crescimento celular em diferentes tecidos. Os EAA podem alterar a função e a estrutura muscular por ocasionarem aumento da AST e do diâmetro de fibras musculares que, em última instância, geram hipertrofia nos músculos cardíaco (Neubauer, 1974; Payne et al. 2004) e esquelético (Kadi, 2000; Sinha-Hikim et al. 2002; Sinha-Hikim et al. 2003; Eriksson et al. 2005). A atividade da testosterona é mediada pelo receptor de andrógeno presente no citoplasma; o complexo formado pela testosterona-receptor migra para o núcleo e se liga a segmentos específicos do DNA, estimulando a expressão gênica e, conseqüentemente, eleva a taxa de síntese protéica (Urban et al. 1995). Além de promover hipertrofia muscular, os EAA também inibem o catabolismo celular ao competirem pelo receptor de glicocorticóides. Outros mecanismos envolvidos na hipertrofia muscular devido à ação de EAA são: incremento da atividade da creatina fosfoquinase no músculo esquelético; incrementos na expressão de receptor e nos níveis circulantes do fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) (Arnold et al. 1996).

O músculo esquelético é um dos tecidos-alvo da ação biológica de EAA (Urban et al. 1995). Os efeitos hipertróficos causados pela administração de EAA são acompanhados não só pelo aumento no número de células satélites (Eriksson et al. 2005; Kadi, 2000) como também no número e localização de mionúcleos (Kadi, 2000; Eriksson et al. 2005; Eriksson et al. 2006a) e de células em processo de “*splitting*” (Eriksson et al. 2006b) e de fibrose (Chipuk et al. 2002). O termo fibra muscular em *splitting* é amplamente utilizado para referir a fibras que parecem ser divididas ou fragmentadas em duas ou mais novas fibras (Antonio & Gonyea 1993; Gonyea et al. 1977; Swash & Schwartz, 1977). Este fenômeno é mais comum em miopatias como a distrofia muscular de Duchenne, polimiosites e dermatosites (Richards et al. 1988; Schwartz et al. 1976). Estas observações levam a alguns autores a considerarem a fibra em *splitting* como

uma mudança degenerativa no músculo (Dubowitz et al. 1973; Kihira & Nonaka 1985). Outras teorias descrevem que quando uma fibra alcança um tamanho crítico, o suporte de oxigênio e as trocas de metabólitos não são eficientes e a fibra se divide para reduzir a distância de difusão (Swash and Schwartz 1977). Evidências a favor desta teoria são o óbvio aparecimento de fendas e a exibição de partes separadas de uma mesma fibra contendo as mesmas características histoquímicas. Estas divisões foram descritas em atletas levantadores de peso levando alguns autores a considerarem serem as fibras em splitting uma fonte de hiperplasia, tanto em levantadores de peso humanos (Larsson and Tesch 1986; Tesch 1988) como animais (Gallanti et al. 1992; Gonyea et al. 1977; Gonyea 1980; Ho et al. 1980). Por outro lado Schmalbruch (1976) mantendo a hipótese de que a divisão de fibras é devido à substituição de fibras necróticas ativadas por células satélites (Schmalbruch 1976). Também foi informado a presença de diferentes tipos de células em splitting (Swash & Schwartz, 1977). Outros autores sugerem que a divisão de fibras possa estar relacionada aos efeitos da desnervação e reinervação do músculo (Balaram et al. 1997; Chou e Nonaka 1977). Portanto, o mecanismo pelo qual as fibras musculares se dividem ou fragmentam ainda não é conhecido. No livro recente *Myology* de Engel e Franzini-Armstrong (2004), foi considerado que o aparecimento de fendas é efeito da divisão ou ramificação das fibras em splitting, considerando esta hipótese puramente um estudo patológico do músculo esquelético (Carpenter and Karpati, 2001). Contudo, todas as hipóteses acima descritas são alternativas à esta discussão. Em estudos mais recentes, foi observado em atletas levantadores de peso usuários de EAA, a presença de um volumoso conteúdo muscular hipertrofiado e de fibras em processo de splitting (Eriksson et al. 2005; Kadi et al. 1999b).

Células satélites ou mioblastos adultos indiferenciados são mioblastos que não se fundiram durante o processo de miogênese e permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal (Mauro, 1961; Muir et al., 1965; para revisão ver Hawke and Garry, 2001; Chargé & Rudnicki, 2004). O número de células satélites no músculo é dependente da espécie, do tipo de fibra considerado e diminui na senilidade (Snow, 1977; Gibson & Schultz,

1982; para revisão ver Schultz & McCormick, 1994). Quando estimulada, a célula satélite é ativada, prolifera e funde-se com a fibra muscular pré-existente. Os núcleos derivados das células satélites começam a sintetizar proteínas musculares específicas que aumentam o volume das fibras musculares através da formação de novos sarcômeros, em posição externa as miofibrilas existentes. O aumento do número de fibras musculares, processo conhecido como hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Goldspink et al., 1972). As células satélites apresentam também a capacidade de migração e essa característica é dependente da integridade da lâmina basal (Watt et al., 1987). Após a ruptura da lâmina basal, em decorrência de um mio-trauma, as células satélites migram para a região da lesão para participar do processo de regeneração muscular, evento mediado pelas citocinas liberadas pelas células inflamatórias no local da lesão (Schultz et al., 1985; Schultz & McCormick, 1994).

As fibras musculares estão envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo; organizado em três bainhas: epimísio, que circunda todo o músculo; perimísio, que divide o músculo em fascículos e endomísio, que circunda cada fibra muscular (para uma revisão ver Sanes, 2003; Kjaer, 2004). Estudos de microscopia óptica revelaram inicialmente que cada fibra muscular está envolvida por um delicado tubo, denominado sarcolema, formado por 3 componentes: fibrilas reticulares, que seguem um curso em espiral ao redor da fibra (Borg & Caulfield, 1980), membrana basal (Zacks et al., 1973; Borg & Caulfield, 1980) e membrana plasmática da fibra muscular. A membrana basal é formada por duas discretas camadas: a lâmina reticular e a lâmina basal (Mauro & Adams, 1961). Posteriormente, estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a lâmina basal é ainda subdividida em lâmina densa (10 a 15 nm de espessura) e lâmina rara (2 a 5 nm de espessura), adjacente à membrana plasmática (Inoue, 1989). Os principais componentes da membrana basal são: laminina, fibronectina, entactina, heparan sulfato e os colágenos dos tipos I, III, IV, V e VI (Duance et al., 1977; Duance et al., 1980; Walsh et al., 1981; Foidart et al., 1981; Sanes, 1982; Stephens et al., 1982; Linsenmayer et al., 1986; Eldridge

et al., 1986; Lehto et al., 1988). Na superfície externa da membrana plasmática, observa-se uma camada de glicoproteínas, o glicocálix, que se continua com a lâmina basal. Poucas moléculas têm sido localizadas no epimísio e no perimísio (Bailey & Sims, 1977; Duance et al., 1977; Duance et al., 1980; Foidart et al., 1981; Sanes, 1982; Stephens et al., 1982; Linsenmayer et al., 1986; Lehto et al., 1988; Light & Champion, 1984). A fibronectina está presente em ambas camadas, bem como os colágenos dos tipos V e VI. O colágeno do tipo I está concentrado no epimísio e o colágeno do tipo III no perimísio, ambos presentes em concentrações maiores no epimísio e perimísio que no endomísio. Laminina e colágeno IV estão presentes no local de contato da lâmina basal com o perimísio, mas ausentes no perimísio e endomísio propriamente ditos.

É bem conhecido que cada núcleo é responsável por manter um certo volume citoplasmático de RNA mensageiro (RNAm) e de proteínas. Este volume é frequentemente chamado de domínio mionuclear (Cheek, 1985). Muito tem sido discutido acerca da capacidade que um núcleo tem de expandir seu domínio nuclear, principalmente com relação ao aumento da síntese e da eficiência no transporte de RNAm (Sinha-Hikim et al. 2003). Recentemente, Kadi et al. (2004) relataram que uma sobrecarga funcional no músculo pode gerar um aumento na atividade de células satélites promovendo mudanças na área da fibra muscular esquelética sem adição de um novo mionúcleo. Kadi et al. (1999b) inferem em seus estudos que, a adição de mionúcleos é uma condição prévia para a hipertrofia muscular esquelética significativa e que os núcleos centrais poderiam existir para auxiliar fibras hipertróficas especialmente grandes. Núcleos centrais poderiam reduzir as distâncias de difusão de um núcleo para partes centrais da fibra. A alta incidência de núcleos internos nos levantadores de peso também possa ser uma característica de regeneração (Eriksson et al. 2006b).

Os mionúcleos de fibras musculares maduras não são capazes de se dividirem. É aceito que a adição de núcleos na fibra vem de células satélites e/ou células tronco (Morgan e Partridge, 2003; Hawke e Garry, 2001). Sinha-Hikim et al. (2003) observaram um aumento significativo no número de células satélites em indivíduos jovens sedentários depois da administração de 300-600 mg de testosterona/semana durante 20 semanas.

No músculo cardíaco, o uso de EAA pode levar ao aumento da massa ventricular esquerda e da densidade septal interventricular como descrito em fisiculturistas usuários de EAA (Sachtleben et al. 1993). Urhausen et al (1989) sugeriram que aumentos contínuos na pressão sanguínea e no tamanho do coração podem resultar em hipertrofia concêntrica compensatória na parede ventricular esquerda por aumento da densidade desta parede ocasionando um menor enchimento ventricular durante a diástole (*redução da luz ventricular*). Frequentemente a hipertrofia cardíaca conduz à insuficiência cardíaca. A dessensibilização de β -adrenoceptores e a transdução de sinal (Bristow, 2000) podem contribuir para a deficiência orgânica contrátil na insuficiência cardíaca. Estudos demonstraram que carvedilol e o metoprolol reduziram o peso do ventrículo esquerdo que quase foi reestabelecido aos valores de peso do grupo controle (Hanada et al. 2008). Antagonistas de β -adrenoreceptores podem reduzir a hipertrofia cardíaca induzida por isoprotenerol, sendo que a densidade de β -adrenoceptores foi completamente restabelecida através do tratamento com metoprolol como foi informado previamente (Heilbrunn et al. 1989).

O metoprolol, um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos, é utilizado na prevenção secundária do infarto do miocárdio, como anti-hipertensivo e no tratamento de arritmias e hipertrofia cardíaca (Vujic et al. 1997). O metoprolol melhora a função do ventrículo esquerdo (sístole e diástole) por atenuar a hipertrofia, reduzir a fibrose intersticial e aumentar a densidade capilar (Waagstein et al. 1975; Waagstein et al. 1993; Sabbah et al. 1994). Ainda que anti-hipertensivos possam causar deficiência significativa na função testicular, ocasionando infertilidade, agentes cardioseletivos como atenolol e metoprolol apresentam menores efeitos deletérios na função sexual (Monoski et al. 2002; Thompson ST. 1994; Buffum, 1986).

Concentrações suprafisiológicas de testosterona podem provocar retroalimentação negativa causando a supressão local na produção endógena do hormônio testosterona no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), o que acarreta hipogonadismo, hipertrofia da próstata e espermatogênese comprometida. (Karbaly-Doust et al. 2007; Koziris, 2000; Takahashi et al. 2004).

De fato, os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), regulam o crescimento testicular, a espermatogênese e a esteroidogênese (Rosenfeld, 1972) no macho. O hormônio de liberação das gonadotrofinas hipotalâmico (GnRH) atua na hipófise anterior, promovendo a liberação de FSH, o qual estimula a gametogênese, bem como a liberação de LH que, por sua vez, estimula a síntese e a secreção de andrógenos (Hardman et al. 1996). Estes últimos são secretados pelas células de Leydig e atingem os túbulos seminíferos e a circulação (Wilson, 1996). Testosterona, dihidrotestosterona e estrogênio atuam no hipotálamo para exercer uma inibição da retroalimentação negativa na liberação do hormônio GnRH. Já que o GnRH estimula o hormônio FSH e o LH na pituitária, esta retroalimentação negativa culmina com a inibição subsequente da produção de testosterona e efeito reverso sobre a espermatogênese (Rosenfeld, 1972).

Vários experimentos em modelos animais e humanos descreveram alterações no sistema reprodutor ocasionadas pelos EAA. Assim, tem sido relatadas reduções significativas no peso dos testículos e epidídimo, na contagem, motilidade e na morfologia espermática de ratos tratados com altas doses de nandrolona (Mesbah et al. 2007; Noorafshan et al. 2005; Torres-Calleja et al. 2001; Clark et al. 1997; Holma, 1977). Tais alterações no sistema reprodutor parecem ser reversíveis após descontinuação do uso da droga (Ludwig 1950; Karbalay-Doust et al. 2007).

Testosterona e EAA são utilizados sob forma oral e injetável tanto no tratamento clínico de doenças como anemia, angioedema hereditário, câncer de mama, depressões e no auxílio terapêutico na cura de feridas e cicatrização (Demling e Orgill, 2000; Chang et al. 1998; Strawford, 1999; Ghaphery 1995; Clark et al. 1997; Lise et al. 1999), quanto por uso abusivo e ilícito, principalmente por fisiculturistas e levantadores de peso, com o intuito de aumentar a massa muscular, o desempenho físico e para preservação e restabelecimento da massa muscular esquelética. Quando usados de forma ilícita e abusiva para o aumento da massa muscular, os EAA são geralmente administrados em doses supra fisiológicas que podem chegar à 500mg/dia em

ciclos que duram entre 4-6 meses. As doses e combinações usadas por atletas são de 10-100 vezes maiores que as doses terapêuticas (Clark et al. 1997; Karbalay-Doust et al. 2005).

Ramo (1987) mostrou uma redução no desempenho de cardíaco de cães tratados com EAA mediada pelas mudanças em β -adrenoceptores. Uma ação prejudicial de altas doses EAA em aumentos adrenergic-mediados em desempenho cardíaco sistólico descrito por Ramo (1987) poderia ser designado a alterações nas condições de carregar cardíaco ou taxa de coração. No momento há não dados que examinam o efeito da administração de EAA em altas doses em respostas de adrenérgicas ionotrópicas em animais sedentários que usam medidas carga-insensíveis de desempenho sistólico a taxas de coração controladas. Norton et al. (2000) demonstraram que a administração crônica de altas doses de EAA reduzem a resposta contrátil do miocárdio à excitação de β -adrenoceptores em ratos sedentários. Entretanto, por eles não foi relatado ou determinado se este efeito é mediado por mudanças em β -adrenoceptores, por eventos pós-receptor, patologia celular ou se esta mudança contribui para a morbidez cardiovascular em atletas que abusam de EAA.

Referências

Antonio J, Gonyea WJ (1993) Skeletal muscle fiber hyperplasia. **Med Sci Sports Exerc** 25:1333–1345.

Arnold AM, Peralta JM, Thonney ML (1996) Ontogeny of growth hormone, insulin-like growth factor-I, estradiol and cortisol in the growing lamb: effect of testosterone. **J Endocrinol** 150(3):391-399.

Bailey AJ, Sims TJ (1977) Meat tenderness: distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. **J Sci Food Agric** 28(6):565-570.

Balaram SK, Agrawal DK, Allen RT, Kuszynski CA, Edwards JD (1997) Cell adhesion molecules and insulin-like growth factor-1 in vascular disease. **J Vasc Surg** 25:866–876.

Bristow MR (2000) β -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. **Circulation** 101:558–569.

Borg TK, Caulfield JB (1980) Morphology of connective tissue in skeletal muscle. **Tissue Cell** 12(1):197-207.

Buffum J (1986) Pharmacosexology update: prescription drugs and sexual function. **J Psychoactive Drugs** 18(2):97-106.

Carpenter S, Karpati G (2001) Pathology of skeletal muscle, **Oxford University Press, New York** 2:100-121.

Chang DW, DeSanti L, Demling RH (1998) Anticatabolic and anabolic strategies in critical illness: a review of current treatment modalities. **Shock** 10:155–60.

Chargé SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev** 84(1):209-238.

Cheek DB (1985) The control of cell mass and replication. The DNA unit—a personal 20-year study. **Early Hum Dev** 12:211–239.

Chipuk JE, Cornelius SC, Pultz NJ, Jorgensen JS, Bonham MJ, Kim SJ, Danielpour D (2002) The androgen receptor represses transforming growth factor-signaling through interaction with Smad3. **J Biol Chem** 277:1240–1248.

Chou SM, Nonaka I (1977) Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. **J Neurol Sci** 34:131–145.

Clark AS, Harrold EV, Fast AS (1997) Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Horm Behav** 31:35–46.

Demling RH, Orgill DP (2000) The anticatabolic and wound healing effects of the testosterone analog oxandrolone after severe burn injury. **J Crit Care** 15:12-17.

Duance VC, Black CM, Dubowitz V et al (1980) Polymyositis — an immunofluorescence study on the distribution of collagen types. **Muscle Nerve** 3(6):487-490.

Duance VC, Restall DJ, Beard H et al (1977) The location of three collagen types in skeletal muscle. **FEBS Lett** 79(2):248-252.

Dubowitz V, Gallup B, Witkowski J (1973) Normal and diseased muscle in tissue culture. **J Physiol** 231:61–62.

Eldridge CF, Sanes JR, Chiu AY et al (1986) Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies. **J Neurocytol** 15(1):37-51.

Engel AG, Franzini-Armstrong C (2004) Myology, **McGraw-Hill**, USA 3(1).

Eriksson A (2006a) Strength training and anabolic steroids. A comparative study of the vastus lateralis, a thigh muscle and the trapezius, a shoulder muscle, of strength-trained athletes. Dissertation, **Umeå University**.

Eriksson A, Kadi F, Malm C, Thornell LE (2005) Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. **Histochem Cell Biol** 124:1–9.

Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell L (2006b) Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters; fiber splitting or defect regeneration? **Histochem Cell Biol** 126:409–417. doi: 10.1007/s00418-006-0176-3b.

Foidart M, Foidart JM, Engel WK (1981) Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. **Arch Neurol** 38(3):152-157.

Gallanti A, Prella A, Chianese L, Barbieri S, Jann S, SchiaVino S, Comini A, Scarpini E, Pellegrini G, Moggio M, et al (1992) Congenital myopathy with type 2A muscle fiber uniformity and smallness. **Neuropediatrics** 23:10–13.

Ghaphery NA (1995) Performance-enhancing drugs. **Orthop Clin North Am** 26:433-442.

Gibson MC, Schultz E (1982) The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. **Anat Rec** 202(3):329-37.

Goldspink G, Wilkes D, Steven E (1972) Myosin expression during ontogeny post-hatching growth and adaptation. In: Johnston IA (Ed.) Muscle development and growth. **Academic Press**: London 318.

Gonyea WJ (1980) Muscle fiber splitting in trained and untrained animals. **Exerc Sport Sci Rev** 8:19–39.

Gonyea W, Ericson GC, Bonde-Petersen F (1977) Skeletal muscle fiber splitting induced by weight-lifting exercise in cats. **Acta Physiol Scand** 99:105–109.

Hanada K, Asari K, Saito M, Kawana J, Mita M, Ogata H (2008) Comparison of pharmacodynamics between carvedilol and metoprolol in rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: Effects of carvedilol enantiomers. **European Journal of Pharmacology** 589:194–200.

Hardman JG, Gilman AG, Linbird LE, Editors (1996) Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. **New York: McGraw-Hill Book Co.**

Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol** 91:534–551.

Heilbrunn, SM, Shah, P, Bristow, MR, Valentine, HA, Ginsburg, R, Fowler, MB (1989) Increased β -receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. **Circulation** 79:483–490.

Ho KW, Roy RR, Tweedle CD, Heusner WW, Van Huss WD, Carrow RE (1980) Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. **Am J Anat** 157:433–440.

Holma PK (1977) Effects of an anabolic steroid (metandienone) on spermatogenesis. **Contraception** 15:151–162.

- Inoue S (1989) Ultrastructure of basement membranes. **Int Rev Cytol** 117:57-98.
- Kadi F (2000) Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids. **Acta Physiol Scand Suppl** 646:1–52.
- Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Thornell LE (1999b) Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. **Med Sci Sports Exerc** 31:1528–1534.
- Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL (2004) The Effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. **J Physiol** 558:1005–1012.
- Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ardekani FM, Mirkhani H (2007) The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats **Asian J Androl** 9(2):235–239.
- Kihira S, Nonaka I (1985) Congenital muscular dystrophy. A histochemical study with morphometric analysis on biopsied muscles. **J Neurol Sci** 70:139–149.
- Kjaer M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev** 84(2):649-698.
- Larsson L, Tesch PA (1986) Motor unit fiber density in extremely hypertrophied skeletal muscles in man. Electrophysiological signs of muscle fibre hyperplasia. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 55:130–136.
- Lehto M, Kvist M, Vieno T (1988) Macromolecular composition of the sarcolemma and endomysium in the rat. **Acta Anat (Basel)** 133(4):297-302.
- Light N, Champion AE (1984) Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. **Biochem J** 219(3):1017-1026.
- Linsenmayer TF, Mentzer A, Irwin MH et al (1986) Avian type VI collagen. Monoclonal antibody production and immunohistochemical identification as a major connective tissue component of cornea and skeletal muscle. **Exp Cell Res** 165(2):518-529.

Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros HMT (1999) O abuso de esteróides anabólicos androgênicos em atletismo. **Rev Ass Med Bras** 45(4):364-370.

Ludwig DJ (1950) The effect of androgen on spermatogenesis. **Endocrinology** 46:453– 481.

Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol** 9:493-495.

Mauro A, Adams WR (1961) The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. **J Biophys Biochem Cytol** 10(4):177-185.

Mesbah SF, Shokri S, Karbalay-Doust S, Mirkhani H (2007) The Effect of Nandrolone Decanoate on the Body, Testis and Epididymis Weight and Semen Parameters in Adult Male Rats. **IJMS** 32(2):93-99.

Monoski M, Nudell DM, Lipshultz LI (2002) Effects of medical therapy, alcohol, and smoking on male fertility. **Contemporary Urology** 6:57-63.

Morgan JE, Partridge TA (2003) Muscle satellite cells. **Int J Biochem Cell Biol** 35:1151–1156.

Muir AR, Kanji AH, Allbrook D (1965) The structure of the satellite cells in skeletal muscle. **J Anat** 99:435-444.

Neubauer M (1974) Hypertrophie des Myocards. Anaboler Effekt auf Herzmuskel. **Sexualmedizin** 11:599.

Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM (2005) High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. **APMIS** 113:122–5.

Norton GR, Trifunovic B, Woodiwiss AJ (2000) Attenuated b-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. **Eur J Appl Physiol** 81:310-316.

Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE (2004) Cardiac effects of anabolic steroids. **Heart** 90:473-5.

Ramo P (1987) Anabolic steroids alter the haemodynamic responses of the canine left ventricle. **Acta Physiol Scand** 130:209-217.

Richards RB, Passmore IK, Dempsey EF (1988) Skeletal muscle pathology in ovine congenital progressive muscular dystrophy 1 Histopathology and histochemistry. **Acta Neuropathol** 77:161–167.

Rosenfeld RL (1972) Role of androgens in growth and development of the fetus, child, and adolescent. **Adv Pediatr** 19.

Sabbah HN, Shimoyama H, Kono T, et al (1994) Effects of longterm monotherapy with enalapril, metoprolol, and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. **Circulation** 89:2852–2859.

Sachtleben TR, Berg KE, Elias BA et al (1993) The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. **Med Sci Sports Exerc** 25:1240-1245.

Sanes JR (1982) Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. **J Cell Biol** 93(2):442-451.

Schmalbruch H (1976) The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. **Tissue Cell** 8:673–692.

Schwartz MS, Sargeant M, Swash M (1976) Longitudinal fiber splitting in neurogenic muscular disorders—its relation to the pathogenesis of “myopathic” change. **Brain** 99:617–636.

Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR (1985) Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. **Muscle Nerve** 8:217-222.

Schultz E, McCormick KM (1994) Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 123:213-257.

Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S (2002) Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 283:154–164.

Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S (2003) Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 285:197–205.

Snow MH (1977) The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. **Cell Tissue Res** 185(3):399-408.

Stephens, HR, Duance VC, Dunn MJ et al (1982) Collagen types in neuromuscular diseases. **J Neurol Sci** 53(1):45-62.

Strawford A, et al (1999) Resistance exercise and supraphysiologic androgen therapy in eugonadal men with HIV-related weight loss: a randomized controlled trial. **JAMA** 281:1282–1290.

Swash M, Schwartz MS (1977) Implications of longitudinal muscle fiber splitting in neurogenic and myopathic disorders. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 40:1152–1159.

Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T (2004) Endocrinological and pathological effects on anabolic-androgenic steroid in male rats. **Endocrine journal** 51(4):425-434.

Tesch PA (1988) Skeletal muscle adaptations consequent to long-term heavy resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc** 20:132–134.

Thompson ST (1994) Prevention of male infertility: an update. **Phenothiazines** 21(3):365-76.

Torres-Calleja J, Gonzalez-Unzaga M, DeCelis-Carrillo R, Calzada-Sanchez L, Pedron N (2001) Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. **Life Sci** 68:1769–74.

Urban RJ, Bodenbunrg YH, Gilkison C, et al (1995) Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. **Am J Physiol** 269(51):820-826.

Urhausen A, Hoples R, Kindermann W (1989) One and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. **Eur J Appl Physiol** 58:633-640.

Vujic Z, Radulovic D, Agbaba D (1997) Densitometric determination of metoprolol tartrate in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 15:581-585.

Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, et al (1993) Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. **Lancet** 342:1441-6.

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnaulskas E, et al (1975) Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockage in congestive cardiomyopathy. **Br Heart J** 37(10):1022-36.

Walsh FS, Moore SE, Dhut S (1981) Monoclonal antibody to human fibronectin: production and characterization using human muscle cultures. **Dev Biol** 84(1):121-132.

Watt DJ, Morgan JE, Clifford MA (1987) The movement of muscle precursor cells between adjacent regenerating muscles in the mouse. **Anat Embryol** 175:527-536.

Wilson JD (1996) Androgens In: GILMAN AG, RALL TW, NIES AS & TAYLOR P. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. **Singapore, McGraw-Hill Book Co** 1441-1457.

Zacks SI, Sheff MF, Saito A (1973) Structure and staining characteristics of myofiber external lamina. **J Histochem Cytochem** 21(8):703-714.

Capítulo II

Esteróide anabolizante associado a antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos ocasiona alterações morfológicas e bioquímicas em músculos estriados de ratos wistar

Página de Título

Envio para a revista: *Histochem Cell Biology*

Fator de Impacto: 2.837

Leonardo Bruno Figueiredo¹, Miguel Maurício Diaz Gomez¹, Daniel Paulino Venâncio², Marcelo Emílio Beletti³, Foued Salmen Espíndola^{1*}.

ESTERÓIDE ANABOLIZANTE ASSOCIADO A ANTAGONISTA SELETIVO DE
RECEPTORES β_1 -ADRENÉRGICOS OCASIONA ALTERAÇÕES
MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM MÚSCULOS ESTRIADOS DE RATOS
WISTAR

¹Instituto de Genética e Bioquímica.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Av. Pará, 1720.CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brasil.

²Departamento de Psicobiologia.

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Rua Marselhesa, 535. Vila Clementino. CEP 04020-060. São Paulo, São Paulo, Brasil.

³Instituto de Ciências Biomédicas.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

* Corresponding Author:

Foued Salmen Espíndola

foued@ufu.br / fspindola@gmail.com

Instituto de Genética e Bioquímica.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Av. Pará, 1720. Bloco 6T Sala 06. 1º. Andar. Campus Umuarama. CEP: 38400-902. Tel. 55(34) 3218-2477/ FAX: 55 (34) 3213-2203. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

Investigaram-se os efeitos da associação de nandrolona e metoprolol sobre a musculatura estriada. Quarenta ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos controle, tratados com nandrolona 20mg/kg/semana, metoprolol 1mg/kg/dia e sua associação. Secções (5µm) do ventrículo esquerdo, sóleo e gastrocnêmio foram obtidas em criostato e coradas com hematoxilina e eosina ou picro sírius red. Imagens digitais foram capturadas e avaliadas por sistema computacional. Foram mensurados a área de secção transversa (AST), o diâmetro, o número de mionúcleos/fibra e de mionúcleos centrais, fibras em *splitting*, domínio mionuclear e o percentual de matriz extracelular. Testosterona sérica foi mensurada. Receptores de glicocorticóide (GR) e de andrógenos (AR) foram analisados por imunodeteção. Houve um aumento nos parâmetros morfométricos analisados tanto em fibras cardíacas como esqueléticas nos animais tratados com nandrolona. Metoprolol em parte reverteu os efeitos hipertroáficos da nandrolona sobre a fibra cardíaca sem reduzir o percentual final de colágeno, porém, seu efeito anabólico foi parcialmente revertido no músculo esquelético. A nandrolona aumentou os níveis séricos de testosterona e promoveu aumento na expressão de AR e menor expressão de GR (P<0,05). Os resultados sugerem a presença de um efeito competitivo inibitório do metoprolol sobre os da nandrolona. Quando administradas em conjunto, o metoprolol parece suprimir o pronunciado efeito hipertrofiante da nandrolona.

Palavras-chave: esteróides anabolizantes, beta-bloqueadores, morfologia, hipertrofia, músculo estriado.

Abstract

The effects of the association of nandrolone with metoprolol on striated muscle were investigated. Forty male Wistar rats were randomly distributed into four groups: control, treated with nandrolone 20mg/kg/week, treated with metoprolol 1mg/kg/day, and treated with both nandrolone and metoprolol. Left ventricle, soleus, and gastrocnemius sections were cut on a cryostat (5µm), and stained with hematoxylin and eosin, or picosirius red. Digital images were captured and analyzed by software. Cross-sectional area (CSA), diameter, number of myonuclei per fiber, central myonuclei, *splitting* cells, myonuclear domain, percentage of non-contractile tissue, and serum testosterone were measured. Glucocorticoid (GR) and androgen receptor (AR) were analyzed by immunodetection. An increase was seen in the morphometric parameters analyzed in both cardiac and striated fibers from animal treated with nandrolone. Metoprolol partially restored the cardiac hypertrophy caused by nandrolone without reducing the final percentage of non-contractile tissue in the ventricle. However, the anabolic effect of nandrolone was not reestablished by metoprolol in the striated fiber. Nandrolone administration increased serum testosterone levels and up-regulated the expression of AR whereas down-regulated the expression of GR ($P<0.05$). Our results suggest that the effects of the association of nandrolone with metoprolol are different in cardiac and muscle fibers.

Keywords: anabolic steroids, cardiac beta-blockers, morphology, hypertrophy, skeletal muscle.

Introdução

Esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são análogos sintéticos ao hormônio sexual testosterona que alteram a função e a estrutura muscular por ocasionarem aumento da síntese protéica, da área de secção transversa (AST) e do diâmetro de fibras musculares, que em última instância, geram hipertrofia nos músculos estriados cardíaco (Neubauer, 1974; Payne et al. 2004) e esquelético (Kadi 2000; Sinha-Hikim et al. 2002; Sinha-Hikim et al. 2003; Eriksson et al. 2005). No músculo cardíaco, o uso de EAA pode levar ao aumento da massa ventricular esquerda e da densidade septal interventricular de fisiculturistas (Sachtleben et al. 1993). Urhausen et al (1989) sugeriram que aumentos contínuos na pressão sanguínea e no tamanho do coração podem resultar em hipertrofia concêntrica compensatória na parede ventricular esquerda por aumento da densidade desta parede ocasionando um menor enchimento ventricular durante a diástole. No músculo estriado esquelético, estes efeitos hipertróficos são acompanhados pelo aumento no número de células satélites (Eriksson et al. 2005) como também no número e localização de mionúcleos (Kadi 2000; Eriksson et al. 2005; Eriksson et al. 2006a; Eriksson et al. 2006b) além de aumento de células em processo de splitting (Eriksson et al. 2006b) e de fibrose (Chipuk et al. 2002). Porém, estudos anteriores além de evidenciar o advento de células em processo de splitting também relataram a presença de núcleos internos na fibra, sugerindo que tais eventos são decorrentes de processos de remodelamento do músculo esquelético, como tem sido observado em miopatias e em atletas usuários de EAA (Eriksson et al. 2006b; Kadi 2000; Eriksson, 2005; Webster et al. 1988).

Estudos prévios (Waagstein et al. 1975; Waagstein et al. 1993; Sabbah et al. 1994) demonstraram que o metoprolol, um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgico, melhora a função do ventrículo esquerdo (sistólica e diastólica) por atenuar a hipertrofia, reduzir a fibrose intersticial e aumentar a densidade capilar. Agentes cardioseletivos tais como o metoprolol, estão associados a uma

menor incidência de efeitos colaterais indesejáveis (Buffum 1986; Pavlović et al. 1999; Bolger e Al-Nasser, 2003).

Nossa hipótese foi que ambas as drogas podem interagir com receptores β -adrenérgicos levando a processos de remodelamento cardíaco e do músculo esquelético. Enquanto que EAA podem levar a um aumento no tamanho da fibra muscular ao interagirem com receptores β -adrenérgicos proliferando tecido conjuntivo e interagindo com receptores nucleares para sintetizar proteínas contráteis, o metoprolol poderia reverter os efeitos do EAA no coração, mas, no entanto, na sua interação com β -adrenoreceptores no músculo esquelético, ocasionaria efeito hipertrófico. Para elucidar tal hipótese, o presente estudo investigou os efeitos da associação destas duas drogas sobre parâmetros morfométricos da musculatura estriada em modelo experimental.

Materiais e métodos

Drogas

Deca-durabolin (Decanoato de nandrolona 50mg/mL) e Seloken (Tartarato de Metoprolol 5mg/mL) respectivamente foram adquiridas de Organon do Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil) e AstraZeneca (São Paulo, SP, Brasil).

Grupos experimentais

Ratos Wistar machos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) padrão *specific pathogen free* (n=40), 60 dias de idade e peso médio de 300g foram distribuídos aleatoriamente em grupos controle veículo-salina (grupo C, n=10), tratados com decanoato de nandrolona e salina (grupo N) (n=10), tratados com tartarato de metoprolol e veículo (grupo M) (n=10), e tratados com decanoato de nandrolona

e tartarato de metoprolol (grupo MN) (n=10). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura ambiente entre 22-25°C, em sala de controle de foto período 12/12h claro-escuro e alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab, São Paulo, SP, Brasil) e água "*ad libitum*". A análise de ingestão alimentar seguiu os parâmetros de cálculo descritos por Bernardes-Amorim et al. (2004), onde o consumo alimentar foi calculado através da diferença entre a ração ofertada e as sobras. Para isto, foi usada a seguinte fórmula: $\Delta\% = [(Massa\ final - Massa\ inicial / Massa\ inicial) \times 100]$. Foram realizadas aplicações intramusculares de 10mg/kg⁻¹ de decanoato de nandrolona duas vezes por semana, durante sete semanas. Estudos anteriores demonstraram efeitos anabolizantes em doses similares sendo equivalente às doses de abuso freqüentemente utilizadas (Woodiwiss et al. 2000; Wimalawansa et al. 1999; Carson et al. 2002; Lee et al. 2003; McClung et al. 2005; Noorafshan et al. 2005; Ferry et al. 2000; Gayan-Ramirez et al. 2000; Bisschop et al. 1997; Joumaa e Leoty 2001; Trifunovic et al. 1995). Também foi administrado intraperitonealmente, 1mg/kg/dia de tartarato de metoprolol durante 7 semanas (Feuerstein et al. 1998; Gok et al. 2007). Para simular o estresse induzido na aplicação das drogas, animais controles receberam respectivamente, injeções intramusculares profundas ou intraperitoneais de veiculo oleoso ou salina em freqüências e volumes similares aos acima propostos (Thompson et al. 2006). Todos os procedimentos de manejo, utilização e eutanásia destes animais seguiram criteriosamente as resoluções propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, 2009) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

Design experimental e coleta das amostras

Ao final de sete semanas de tratamento, os animais foram pesados em balança analítica, anestesiados por aplicação intraperitoneal de xilazina e quetamina (9.9 mg/kg xylazina e 50 mg/kg ketamina) e sacrificados por decapitação em guilhotina. Posteriormente à eutanásia, biópsias dos músculos

sóleo e gastrocnêmio esquerdos foram realizadas sempre na porção medial central. Ventrículo esquerdo também foi coletado. Para análise de expressão de proteínas, as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em pistilo e armazenadas em -80° C. Amostras para análises histológicas foram desidratadas em amido, envolvidas em Tissue tek, optimal critical temperature compound (Miles laboratories, Naperville, IL, USA), fixadas em cortiças, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer à -80° C até a posterior análise. Dados biométricos de peso dos músculos e ventrículo esquerdo foram previamente realizados em balança analítica. O peso relativo dos tecidos foi determinado dividindo-se o valor obtido pelo peso total do animal no dia do sacrifício. Antes dos músculos serem dissecados, mediu-se seu comprimento usando paquímetro de alta precisão.

Imunohistoquímica

Secções seriais (5 μ m) dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram obtidas em criostato a -20° C e usadas para a análise pelo método de imunohistoquímica (IH). Estas foram re-hidratadas em PBS 0.01M, bloqueadas com 0.1M de glicina em PBS, tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3 % para bloqueio da peroxidase endógena, imersas em BSA 3% e incubadas com anticorpos primários biotinizados (overnight) a $2-8^{\circ}$ C. Foi realizada incubação por quarenta e cinco minutos com complexo ABC em proporções iguais do reagente A (avidina) e reagente B (biotina ligada a peroxidase) (Vector Laboratories, Orton Southgate, Peterborough, UK). Anticorpos secundários foram incubados por 4hrs. A visualização da ligação dos anticorpos primários foi realizada pela revelação utilizando 3-3-tetra-hidrocloro de diaminobenzidina (Sigma, Saint. Louis, MO, USA). Secções de controle negativo foram tratadas, analisadas e reveladas de acordo com o mesmo protocolo de todas as outras secções, com exceção da adição dos anticorpos primários a estas secções. Todas as secções foram contra-coradas com hematoxilina. Os seguintes anticorpos primários foram analisados: anti-receptor de glicocorticóide (GR IH 1:150, cód. sc-1004), anti-

receptor de andrógeno (AR IH 1:150, cód. sc-816) foram adquiridos da Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo secundário (anti-rabbit 1:2500, cód. RPN 1004) foi adquirido de General Electric Life Sciences (Piscataway, NJ, USA).

Análises morfométricas em microscopia de luz

Para a análise e determinação da área seccional transversa (AST), diâmetro das fibras musculares e dos percentuais de tecido conjuntivo (matriz extracelular) dos músculos cardíaco e esqueléticos, uma média de 275 fibras foi fotografada utilizando um microscópio de luz (Olympus Ltd. Watford, Hertfordshire, UK) em uma objetiva de 10x conectado a um sistema de captura e análise de imagens computadorizado. As fibras foram analisadas utilizando o software HL Image 97 (Western Vision Software, Layton, Utah, USA). Todas as secções foram aqui coradas com hematoxilina e eosina (H.E.). A área de secção transversa das fibras musculares foi mensurada medindo a área total da fibra (dados apresentados em μm^2). O diâmetro (μm) foi mensurado traçando uma linha linear entre um ponto a outro de uma mesma fibra muscular transversa, utilizando o menor diâmetro nuclear como padrão para localização do plano da fibra. Para a quantificação do percentual de tecido conjuntivo, lâminas de músculo estriado foram coradas utilizando o método de coloração Picrosírius Red. A análise morfométrica foi realizada utilizando mesmo software HL Image 97. Foram selecionados 10 campos aleatórios/lâmina dentro de áreas com maior proporção de fibras musculares, evitando quantificar vasos, capilares e as fâcias musculares os quais foram mensurados analisando o percentual de pixels por área em cada campo visual selecionado.

Proporção de fibras contendo núcleos internos, proporção de células em *splitting*, e os domínios mionucleares, foram também analisados nos músculos estriados esqueléticos sóleo e gastrocnêmio. As mesmas fibras foram utilizadas para contagem de mionúcleos por fibra e análise da frequência de fibras

contendo núcleo interno. A proporção de fibras contendo núcleo interno foi calculada por: [número de fibras contendo núcleo interno] / [número total de fibras] x 100. Como cada secção transversal mensurada era de 5µm de espessura, a área da fibra na verdade, representa um volume seccional igual para área x 5µm. Em outras palavras, esta é uma relação linear entre área e volume. O domínio mionuclear foi calculado utilizando a seguinte fórmula: [número de núcleo por fibra] / [área da fibra]. Uma fibra em *splitting* é definida por apresentar em seu conteúdo fissuras e rachaduras entre a membrana basal. Estas fibras foram fotografadas e contadas em todas as secções musculares (média de 449 fibras/secção). A proporção de fibras em *splitting* foi calculada como segue: [número de fibras em *splitting*] / [número total de miofibras] x 100. As imagens digitais foram processadas utilizando o software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA) (Eriksson 2006a). Todas as secções foram analisadas sem que o observador conhecesse o tipo de tratamento dos animais (análise cega) (Dubowitz et al. 1972; Saad et al. 2002).

Dosagens bioquímicas

Para a análise de testosterona sérica total, amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca. Uma alíquota de soro foi congelada à -20°C para a avaliação. A testosterona foi mensurada por ensaio imunométrico de quimiluminescência (Advia Centaur Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA). Os limiares de detecção para testosterona foram de 10 ng/dL (Ortho-Clinical Diagnostics Inc., Amersham, England) (Baume et al. 2006; Venâncio et al. 2008). Para a dosagem de proteínas totais, frações dos músculos esquelético (sóleo e gastrocnêmio) e cardíaco (ventrículo esquerdo) foram homogeneizadas em homogeneizador elétrico, usando soluções geladas. Extraíu-se 100 mg/mL, de tecido congelado a -80 °C em tampão de extração 40 mM HEPES pH 7,7, 10 mM EDTA, 2mM EGTA, 2mM DTT e 1 mM Benzamidina. Proteína total presente no homogeneizado foi então dosada pelo método de Bradford, (1976). Para a

análise de glutamina e glutamato, o homogeneizado foi centrifugado a 14.000g por dois minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente removido e aliquoteado. A dosagem do sobrenadante foi realizada em analisador bioquímico (YSI 2700, Yelow Springs, OH, USA).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média±desvio-padrão da média (DPM). Os dados foram comparados através da análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey-Kramer foi utilizado para verificar as diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

Resultados

Mensurações de parâmetros físicos e biométricos

A massa corporal inicial não foi diferente entre os grupos C, M, N e MN. No final do período experimental, o peso final e o ganho de peso corporal dos animais foram maiores para o grupo M, apresentando diferenças em relação aos demais grupos. No final do período experimental, os grupos M e MN apresentaram uma redução na massa corporal; contudo, nenhuma diferença foi observada entre os grupos N e MN. Apesar do grupo MN perder peso em relação ao C, este não se diferiu do grupo M. Quando analisado a percentagem de ganho de peso corporal, os grupos N e MN, apresentaram maiores valores que os grupos C e M (Tabela 1). De acordo com os dados de ingestão alimentar, os valores de todos os grupos apresentaram diferenças pelo teste de Tukey-Kramer em $P < 0,05$ (Tabela 1).

O peso relativo do coração e dos músculos gastrocnêmio e sóleo foi alterado pelos diferentes tratamentos. O tratamento com nandrolona ocasionou um aumento no peso relativo destes tecidos estudados. Tais alterações foram significativamente maiores apenas no grupo N. Entretanto, o tratamento com metoprolol demonstrou mudanças mais expressivas a avaliação do peso relativo no músculo sóleo que no gastrocnêmio. Nenhum dos tratamentos alterou o diâmetro (cm) e o tamanho (cm) do coração (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos animais controle e submetidos ao tratamento com metoprolol, nandrolona e associação de metoprolol e nandrolona.

Parâmetros	C	M	N	MN	P value
<i>Massa Corporal(g)</i>					
Inicial	294,3±21,7a	293,7±17,8a	294,3±22,1a	294,3±20,9a	0,9999
Final	395,4±29,7a	377,7±26,9ac	337,1±29,7b	354,9±11,1bc	<0,0001
Ganho	101,1±15,9a	84,0±20,1a	42,8±12,9b	60,6±22,1b	<0,0001
Ganho percentual (%)	74,4±3,0a	77,9±4,2ac	87,4±3,2b	82,9±6,1bc	<0,0001
Eficiência alimentar (g)	25,3±0,5a	27,3±0,7b	32,1±0,4c	33,9±0,2d	<0,0001
<i>Relação massa tecido/massa corporal (g)</i>					
Sóleo	0,75±0,19a	0,80±0,17a	1,05±0,21c	0,99±0,19b	0,0308
Gastrocnêmio	3,11±0,91a	2,91±0,79a	3,48±0,81b	3,01±0,84a	0,0021
Coração	3,29±0,25a	3,17±0,21a	3,48±0,23b	3,28±0,13a	0,0244
Diâmetro coração (cm)	1,45±0,10a	1,33±0,16a	1,39±0,08a	1,35±0,16a	0,2631
Tamanho coração (cm)	1,41±0,14a	1,38±0,13a	1,48±0,10a	1,38±0,09a	0,2898

Valores representados por média±desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 ou (n=10). Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Estudo morfológico e imunohistoquímica

Os grupos N e MN apresentaram uma maior ocorrência de fibras hipertróficas e endomísio e perimísio mais acentuado ocasionado pelo aumento

de tecido conjuntivo ou colágeno (Figura 1, HE ou picro-sírius red; Tabela 3). A análise morfológica revelou um maior número de fibras contendo núcleos centrais, células em *splitting*, diâmetro e maior área de secção transversa (AST) no músculo gastrocnêmio do grupo N quando comparado com os demais grupos (ver ampliação Figura 1, HE). Interessante ressaltar que apesar de apresentar um aumento de tecido conjuntivo nos animais tratados com metoprolol nota-se a presença de fibras maiores quando comparados aos controles. O grupo MN apresentou um pronunciado aumento da AST quando comparado aos grupos C e M (Tabela 3), contudo menos expressivo que o observado no grupo tratado com nandrolona. Foram observadas mudanças na expressão dos receptores AR e GR no músculo gastrocnêmio após os diferentes tratamentos (Figura 1, anti-AR e anti-GR). Maior expressão de AR foi observada em secções de animais tratados com nandrolona e sua associação com metoprolol. De forma antagônica, os grupos tratados com nandrolona apresentaram uma menor expressão de GR quando comparados com controle e metoprolol. Os resultados mostraram um aumento homogêneo na expressão de AR em regiões perinucleares e uma conseqüente redução da expressão de GR. Contudo, a redução na expressão de GR parece ser acompanhada por uma compactação e redistribuição destes receptores em regiões próximas aos núcleos da fibra muscular (perinucleares). Tal fato é comprovado pelas marcações positivas observadas nas regiões perinucleares.

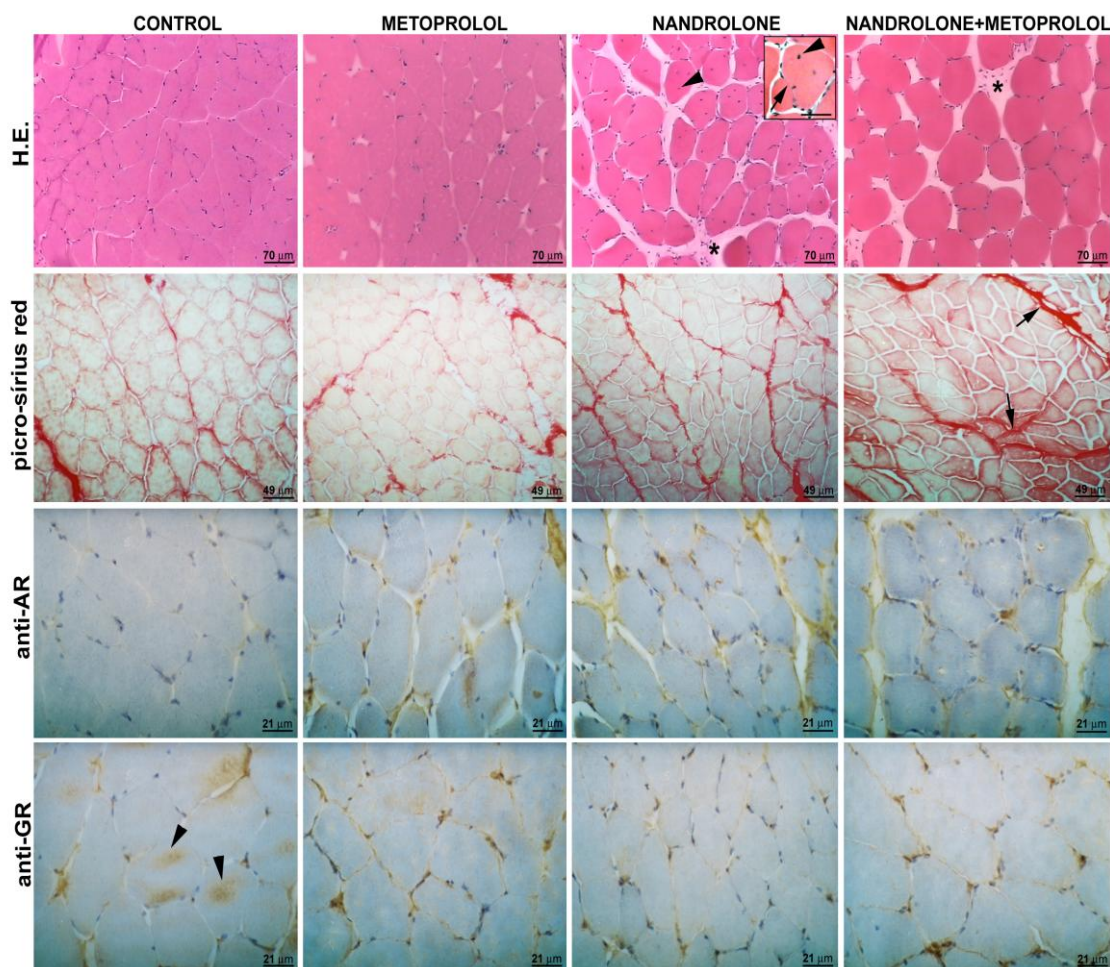


Figura 1. Secções seriadas (5µm) de gastrocnêmio de animais controle, tratados com metoprolol, nandrolona e associação de nandrolona com metoprolol. Secções coradas com H.E. ou picro-sírius red e imunodeteccção de receptor de andrógeno (AR) e de glicocorticóide (GR). Nas secções transversais coradas com H.E., observar a ocorrência de fibras hipertróficas e endomísio e perimísio mais acentuado ocasionado pelo aumento de tecido conjuntivo nos grupos tratados (M, N e MN) (*asterisco*). Notar a presença de núcleos centrais (*cabeça de seta*) nas miofibras e maior ocorrência de fibras em *splitting* (*seta no detalhe*) nos animais tratados com nandrolona. Em secções coradas com picrosírius red, notar a maior presença de tecido conjuntivo nos grupos tratados (*seta*). Imunodeteccções de AR contra-coradas com hematoxilina. Observar maior presença de AR nas regiões perinucleares e citoplasmáticas nos diferentes grupos tratados com nadrolona quando comparados ao controle (*anti-AR*). Imunodeteccções de GR contra-coradas com hematoxilina. Observar maior presença

deste receptor no grupo controle nas regiões perinuclear e citoplasmática (*cabeça de seta*) e menor nos grupos tratados com nandrolona (*anti-GR*).

Testosterona sérica total e dosagens bioquímicas musculares

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no soro (testosterona total), no homogeneizado e fração sobrenadante dos músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio) e cardíaco (ventrículo esquerdo) onde foram avaliadas respectivamente as concentrações de proteína total, de glutamato e glutamina. A análise das concentrações de testosterona sérica total revelou que existe diferença apenas nos grupos que receberam nandrolona, apresentando maiores concentrações de testosterona que os grupos controle e metoprolol (Tabela 2). Não houve diferenças relacionadas à concentração de proteína total (Tabela 2). Em relação à concentração de glutamato no ventrículo esquerdo (VE), foram encontradas diferenças entre o grupo M e todos os demais grupos. No músculo sóleo, todos os grupos apresentaram diferenças entre si na concentração de glutamato, com exceção dos grupos N e M. Não houve diferenças entre os grupos na concentração de glutamato do músculo gastrocnêmio (Tabela 2). Em relação à concentração de glutamina, nenhuma diferença foi encontrada no VE. Por outro lado, houve diferenças na concentração de glutamina do músculo sóleo para os grupos tratados com anabolizante (N e MN) em relação aos outros grupos enquanto que para o músculo gastrocnêmio, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de testosterona total sérica, proteína total, glutamato e glutamina nos músculos esqueléticos (sóleo, gastrocnêmio) e cardíaco (ventrículo esquerdo).

<i>Parâmetros</i>	C	M	N	MN	P value
Testosterona Total (ng/dL)	120,8±61,2a	143,0±18,0a	239,6±49,6b	253,3±112,3b	0,0003
<i>Proteína Total (µg/µL)</i>					
VE	3,17±0,71a	3,78±0,18b	3,87±0,20c	3,90±0,26c	0,0251
Sóleo	3,94±0,19a	4,08±0,04b	4,49±0,47d	4,37±0,16c	0,0321
Gastrocnêmio	4,06±0,32a	4,33±0,24b	4,57±0,10c	4,60±0,06c	0,0084
<i>Glutamato (mmol/L)</i>					
VE	0,97±0,61a	2,76±0,60b	0,91±0,02a	1,02±0,10a	<0,0001
Sóleo	1,47±0,08a	1,36±0,07b	1,24±0,04c	1,17±0,04c	<0,0001
Gastrocnêmio	1,45±0,04a	1,36±0,11a	1,47±0,07a	1,47±0,11a	0,0571
<i>Glutamina (mmol/L)</i>					
VE	1,44±0,86a	2,13±0,07a	2,22±0,35a	2,1±0,44a	0,3019
Sóleo	1,75±0,15a	1,92±0,22a	1,11±0,01b	1,23±0,09b	0,0003
Gastrocnêmio	1,75±0,60a	2,20±0,27a	2,07±0,22a	2,03±0,21a	0,5162

Valores representados por média±desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 ou ($n=10$). VE=ventrículo esquerdo. Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Dados morfométricos

Os dados morfométricos encontrados nos músculos estriados de ratos Wistar, controle e tratados ou não com nandrolona e metoprolol e sua associação, foram obtidos pelas análises dos seguintes parâmetros: área de secção transversa (AST), diâmetro, número de núcleo por fibra, proporção de fibra com núcleos internos, proporção de fibras em *splitting*, domínio mionuclear e percentual de tecido não contrátil. A análise da AST no músculo esquelético revelou que o tratamento com nandrolona ocasionou um efeito pronunciado

sobre o músculo sóleo de quase 10 vezes maior que o aumento da área da fibra em relação ao grupo controle. O tratamento com metoprolol também ocasionou um aumento na AST no sóleo e no gastrocnêmio. Entretanto, quando ambos os tratamentos foram combinados, o metoprolol apresentou efeito inibitório marcante sobre a AST no grupo MN. Foi claramente demonstrado o efeito marcante do metoprolol sobre o tratamento com a nandrolona nestes músculos, prevalecendo um efeito similar ao evidenciado pelo tratamento com metoprolol de forma isolada. Efeito antagônico sobre o músculo esquelético foi observado no coração. A administração de metoprolol ocasionou uma redução na AST e no diâmetro de cardiomiócitos no grupo M. Da mesma forma, tal efeito cardioprotetor induzido pelo tratamento com metoprolol foi observado no grupo MN, demonstrando uma interferência no efeito hipertrofiante da nandrolona (Tabela 3). De modo geral, comparando os dados de diâmetro da fibra, observou-se que os mesmos apresentam comportamento semelhante aos dados obtidos de AST, sugerindo que estas mensurações são equivalentes na identificação do tamanho da fibra (Tabela 3).

O músculo gastrocnêmio apresentou um aumento de mais de duas vezes no número de núcleos por fibra para o tratamento com nandrolona enquanto que para o músculo sóleo este aumento foi significativo em relação ao controle, mas não tão pronunciado. O tratamento com metoprolol induziu um pequeno aumento no número de núcleos para ambos os músculos. Todavia, a associação de metoprolol com nandrolona levou a um aumento no número de núcleos em relação ao controle para ambos os músculos, mas parece inibir o efeito marcante da nandrolona sobre o músculo gastrocnêmio.

O tratamento com nandrolona aumentou a quantidade de núcleos internos nos dois músculos esqueléticos analisados, porém no músculo gastrocnêmio este efeito foi pelo menos duas vezes maior que o observado para o músculo sóleo. Também, o tratamento com metoprolol levou a um aumento no número de núcleos internos em torno de 170% para o sóleo e o gastrocnêmio. O metoprolol não teve um efeito inibitório sobre a ação da nandrolona no músculo sóleo; assim, o grupo MN apresentou um valor aumentado similar ao do grupo N. Entretanto, esta associação aumentou em 250% o número de núcleos em

relação ao controle no gastrocnêmio, o que equivale à metade do efeito observado no grupo N (Tabela 3). A análise da proporção de fibras em *splitting* revelou que o fenômeno ocorre nos dois tipos de músculo estriado esquelético aqui investigados. Fibras que apresentam fendas e/ou fissuras em toda sua área são definidas como fibras em *splitting* e pode ser devido a um processo de dano e regeneração do músculo. Este fenômeno de fissuras e fendas dentro da membrana basal destas fibras foi no presente estudo desencadeado pelo dois tipos de tratamento com β -bloqueador e anabolizante. Mas neste caso, o sóleo foi mais sensível à nandrolona apresentando quase 15 vezes mais fibras deste tipo que no grupo C. O sóleo também foi mais sensível ao metoprolol, observando-se 4 vezes mais fibras em *splitting* que no gastrocnêmio. Além do mais, o metoprolol reduziu à metade o efeito causado pela nandrolona isoladamente.

O aumento percentual de tecido conjuntivo observado nos músculos estriados indicou um elevado aumento na matriz extracelular ocasionado pelos diferentes tratamentos sobre os grupos estudados (M,N e MN). Houve um efeito homogêneo da nandrolona sobre os três músculos, que apresentaram um aumento em torno de 170% da área não contrátil. O tratamento com metoprolol causou um aumento da área não contrátil apenas para o músculo gastrocnêmio. No ensaio em que houve associação de metoprolol com nandrolona, houve redução do efeito da nandrolona sobre esta área apenas para o ventrículo esquerdo (56%) e sóleo (82%).

Tabela 3. Parâmetros morfométricos analisados nos músculos estriados de ratos Wistar tratados ou não com metoprolol, nandrolona e com a associação de metoprolol e nandrolona.

Parâmetros	Ventrículo esquerdo				P value
	C	M	N	MN	
AST (μm^2)	300 \pm 116a	259 \pm 100b	388 \pm 140d	347 \pm 137c	<0,0001
Diâmetro da fibra (μm)	10,4 \pm 1,6a	8,7 \pm 1,5b	19,0 \pm 1,8d	9,2 \pm 1,4c	<0,0001
% Matriz extracelular	7,1 \pm 0,6a	8,3 \pm 0,4ae	12,1 \pm 1,1d	9,4 \pm 1,4ce	<0,0001

Sóleo					
Parâmetros	C	M	N	MN	P value
AST (μm^2)	1096 \pm 313a	1751 \pm 750b	9141 \pm 820c	1719 \pm 690b	<0,0001
Diâmetro da fibra (μm)	27,9 \pm 6,3a	30,3 \pm 6,3b	34,6 \pm 7,2c	32,4 \pm 7,5d	<0,0001
Núcleo/fibra	2,4 \pm 0,9a	2,8 \pm 1,0b	2,7 \pm 0,9b	2,8 \pm 0,9b	<0,0001
Proporção de fibras com núcleos internos (%)	4,8 \pm 1,09a	8,0 \pm 1,33b	12,0 \pm 2,15c	12,9 \pm 1,93c	<0,0001
Proporção de fibras em <i>splitting</i> (%)	0,11 \pm 0,02a	0,47 \pm 0,05b	1,62 \pm 0,3d	0,97 \pm 0,02c	<0,0001
Domínio mionuclear	550,4 \pm 310,5a	737,5 \pm 525,6b	3221,0 \pm 673,2d	721,0 \pm 517,4c	0,0090
% Matriz extracelular	6,5 \pm 0,1a	7,3 \pm 2,2a	11,3 \pm 0,4b	7,4 \pm 2,6a	<0,0001

Gastrocnêmio					
Parâmetros	C	M	N	MN	P value
AST (μm^2)	3812 \pm 1058a	5772 \pm 1878b	6198 \pm 1530c	5767 \pm 1724b	<0,0001
Diâmetro da fibra (μm)	62,12 \pm 11,38a	73,07 \pm 17,32b	78,09 \pm 14,33c	74,92 \pm 16,05d	<0,0001
Núcleo/fibra	3,2 \pm 1,6a	4,0 \pm 2,44b	7,5 \pm 3,22c	4,4 \pm 2,33b	<0,0001
Proporção de fibras com núcleos internos (%)	7,6 \pm 3,0a	12,8 \pm 2,9a	40,0 \pm 13b	19,2 \pm 3,8a	<0,0001
Proporção de fibras em <i>splitting</i> (%)	0,24 \pm 0,03a	0,30 \pm 0,04a	1,60 \pm 0,31b	0,78 \pm 0,06a	<0,0001
Domínio mionuclear	1547 \pm 1049a	2211 \pm 1927b	993 \pm 935c	1962 \pm 1530b	<0,0001
% Matriz extracelular	7,1 \pm 0,3a	10,0 \pm 0,7b	12,5 \pm 1,0c	12,2 \pm 0,5c	<0,0001

Valores representados por média \pm desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 ou ($n=10$). AST= área de secção transversa. Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Discussão

Os resultados mostraram que 7 semanas de tratamento com nandrolona (20mg/kg/semana) e sua associação com metoprolol (1mg/kg/dia) tem efeito negativo na massa corporal. Outros estudos experimentais relataram resultados ambíguos nas medidas de massa corporal. Predominaram relatos de redução da massa corporal em animais tratados com doses de EAA similares às utilizadas no presente estudo (Beiner et al. 1999) o que pode estar inserido à diminuição do apetite (Kochakian et al. 1959) e a menor expressão de AR (Rance e Max, 1984). Estes fatores poderiam inibir o crescimento corporal. Ainda que a massa magra total não tenha sido avaliada no presente estudo, a análise do peso relativo em relação à AST e o diâmetro das fibras musculares dos músculos sóleo e gastrocnêmio e do ventrículo esquerdo nos permitem sugerir que houve um aumento da massa magra ocasionado pelo tratamento com nandrolona já que os animais não foram submetidos a nenhum tipo de atividade física e tanto água quanto ração foram oferecidas *ad libitum* ao longo do estudo, tal fato se comprova. Tal resultado corresponde parcialmente com aquele descrito por Joumaa e Leoty (2001), no qual somente o músculo cardíaco e não o esquelético foi afetado pela administração de nandrolona. Sobre a eficiência alimentar, nossos resultados nos levam a crer que os diferentes tratamentos tenham levado a um aumento no metabolismo o qual levou a uma maior ingestão alimentar. Em relação ao metoprolol, segundo Messerli et al. (2007) o mecanismo patofisiológico pelo qual os β -bloqueadores levam ao aumento da massa corporal está obscuro. Estudos anteriores têm relatado um aumento de massa corporal devido à sua administração (Sharma et al. 2001; Messerli et al. 2007). Contudo, o aumento excessivo de massa corporal ocasionado pelo uso de β -bloqueadores tem sido associado ao acúmulo de massa gorda. Pacientes diabéticos e/ou hipertensos tratados com tartarato de metoprolol tiveram um significativo ganho de peso (>7%) em relação aos pacientes tratados com um outro bloqueador de receptores β -adrenérgicos, o carvedilol (Messerli et al. 2007). Uma análise sistemática foi executada envolvendo 7048 pacientes (3205

uso de terapia com bloqueadores de receptores β -adrenérgicos – metoprolol, propanolol e atenolol) a qual informou um maior aumento no peso destes pacientes ocasionado pelo tratamento com β -bloqueadores (Sharma et al. 2001). Nossos resultados nos permite dizer que o metoprolol ocasionou um aumento na massa corporal e da massa muscular nos músculos esqueléticos.

Além de incrementar a densidade óssea (Bhasin et al. 2001), a testosterona também tem sido caracterizada pela sua habilidade para promover a retenção de nitrogênio (Ferrando et al. 1998; Evans 2004). O potencial para reter nitrogênio na massa magra através do estímulo da síntese de proteínas e/ou redução da degradação de proteínas é definido como anabolismo (Kuhn 2002). Evidência emergente sugere que os EAA exercem um efeito positivo no músculo ao influenciar o tamanho da fibra, assim como o metabolismo de proteínas (Kuhn 2002). Estudos anteriores relataram incrementos na síntese protéica muscular após a administração de testosterona (Brodsky et al. 1996; Griggs et al. 1989; Urban et al. 1995). Contudo, nossos resultados demonstraram que os diferentes tratamentos não exerceram efeito sobre a concentração de proteína total nos músculos cardíaco e esquelético. Ferrando et al. (1998), em um estudo com aminoácidos marcados radioativamente (fenilalanina, leucina e lisina), descreveram um aumento na síntese protéica muscular em humanos em jejum sem incrementos o transporte interno de aminoácidos na célula após administração de testosterona. Eles concluíram que o tratamento com testosterona em humanos em quadro de jejum faz com que os aminoácidos resultantes da quebra de proteínas sejam direcionados novamente para a síntese ao invés de serem liberados ao meio extracelular. Resultados similares foram observados por Brodsky et al. (1996), onde a terapia de reposição de testosterona, em pacientes com hipogonadismo, causou notáveis incrementos na massa muscular magra através da incorporação de leucina no músculo esquelético, assim como uma aprimorada taxa de síntese de miosinas de cadeia pesada. De forma semelhante, encontramos concentrações de proteína total ligeiramente maiores nos músculos esqueléticos e cardíaco dos animais tratados. Isto poderia indicar que a retenção de nitrogênio no músculo é uma das variáveis responsáveis pela hipertrofia depois do tratamento com EAA e/ou

metoprolol. No entanto, quando considerados individualmente, as concentrações de glutamina e glutamato nestes grupos não diferiram dos animais controles (ver Tabela 2). Tais valores podem refletir diferenças nas concentrações destes aminoácidos no músculo estriado, assim como nas concentrações de outros aminoácidos encontradas anteriormente em outro estudo (Ferrando et al. 1998).

Resultados controversos têm sido relatados na literatura em relação aos níveis de testosterona sérica após administração de EAA, tanto em modelos animais quanto em humanos. Tanto altas e baixas concentrações de testosterona sérica foram observadas em humanos (Maravelias et al. 2005; Venâncio et al. 2008), as quais se manifestaram juntamente aos efeitos adversos como atrofia testicular, oligospermia, impotência entre outros (Clark et al. 1997), no entanto, tais fatos não têm sido observados em modelos animais. Bitran et al. (1996) observaram um aumento de 7 a 10 vezes no propionato de testosterona após uma e duas semanas respectivamente de tratamento com 10mg/kg/dia de dianabol. Semelhantemente, Takahashi et al. (2004) relataram um aumento nas concentrações de testosterona sérica em ratos ao utilizar a combinação de decanoato de nandrolona, acetato de metelonona e dromostanolona e/ou somente decanoato de nandrolona + salina após um ciclo de 12 semanas com um intervalo de 4 semanas iniciado na sexta semana. Este último experimento utilizou concentrações cem vezes maiores que aquelas encontradas em humanos saudáveis. No presente estudo observamos, mesmo com a utilização de doses menores (20mg/kg/semana de nandrolona), um incremento de duas vezes nas concentrações de testosterona total sérica nos animais tratados com nandrolona, assim como no grupo tratado com a associação desta com metoprolol. Efeitos adversos similares àqueles observados em humanos têm sido encontrados no sistema reprodutor de ratos (Takahashi et al. 2004; Karbalay-Doust et al. 2007). Em estudo prévio (*capítulo 3*), demonstramos oligospermia e azoospermia em ratos sedentários tratados com as mesmas doses de decanoato de nandrolona. Entretanto, quando alguns dos efeitos adversos de altas doses de EAA são similares em humanos e ratos, as diferenças nos níveis séricos de testosterona podem ser atribuídas ao metabolismo dos EAA ou ainda ao eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA).

No presente estudo constatou-se que o metoprolol reduziu a hipertrofia cardíaca e da musculatura esquelética ocasionada pelo tratamento com EAA; entretanto, houve um pronunciado aumento no percentual de tecido conjuntivo como observado na Tabela 3 e Figura 1. Estes resultados estão de acordo com os descritos por White et al. (1989) nos quais o tratamento com metoprolol em pacientes hipertensos, resultou na regressão da massa ventricular esquerda e melhora significativa no enchimento do ventrículo durante a diástole. Trimarco et al. (1989) e Habib et al. (1994) confirmaram estes resultados e ressaltam a importância da reversão da hipertrofia ventricular esquerda e controle da pressão arterial diastólica na melhoria da função cardiovascular. Alguns estudos têm sugerido que a regressão da hipertrofia ventricular poderia aumentar o percentual de fibrose e, assim, diminuir a funcionalidade do ventrículo (Agati et al. 1987), já que a redução da fibrose é considerada adjuvante na regeneração tecidual após o dano (Roberts et al. 2001). Assim, torna-se claro o aumento da matriz extracelular na musculatura estriada mesmo após a regressão da hipertrofia ocasionada pelo metoprolol em nosso estudo. Por outro lado, nossos resultados demonstraram que a nandrolona causou de fato hipertrofia muscular, tanto no músculo cardíaco quanto no esquelético. Urhausen et al. (1989) descreveram que o uso de EAA aumenta a densidade septal interventricular, a pressão sanguínea e a massa ventricular esquerda, resultando em hipertrofia concêntrica compensatória da parede ventricular esquerda inclusive após a interrupção do uso. Tais resultados foram demonstrados em fisiculturistas e levantadores de peso usuários e ex-usuários de EAA (Sachtleben et al. 1993).

É descrito que andrógenos podem alterar a função regenerativa do músculo estriado (Kelso et al. 1989), alterando a atividade de fibroblastos e suprimindo a sinalização de células dependentes gerando fibrose (Chipuk et al. 2002). Isto parece ser a resposta para aumento pronunciado de tecido conjuntivo nos grupos tratados com nandrolona. Estudo similar utilizando o EAA estanozolol, também demonstrou um aumento na síntese de colágeno dermal sem alterar a replicação de fibroblastos (Falanga et al. 1998). A expansão da matriz extracelular com o tratamento de nandrolona pode estar relacionada a diversos fatores como edema e fibrose. Já que a testosterona é um potente

hormônio anabolizante com múltiplas ações biológicas, é provável que possa alterar a resposta regenerativa no músculo estriado.

Nossos resultados demonstraram uma grande correlação entre a área das fibras musculares e o número de mionúcleos. Animais tratados com nandrolona apresentaram fibras maiores e maior número de mionúcleos por fibra, tanto nas regiões sub-sarcolemal como na região interna das fibras. Modelos humanos que analisaram a hipertrofia muscular pelo uso de EAA descreveram que este fenômeno é acompanhado por um aumento no número de mionúcleos e de células satélites (Kadi 2000; Eriksson et al. 2005; Eriksson 2006a; Eriksson et al. 2006b). Uma correlação similar foi observada em estudos no músculo trapézio em humanos (Kadi et al. 1999b). Sinha-Hikim et al. (2002) demonstraram em um estudo com usuários de EAA, um aumento significativo no número de mionúcleos em relação à área da fibra. Certamente, estes resultados apóiam a idéia de que o número de mionúcleos representa um papel importante no mecanismo de hipertrofia das fibras musculares estriadas (Edgerton e Roy 1991; Allen et al. 1999; Kadi 2000).

É bem conhecido que cada núcleo suporta um certo volume citoplasmático de RNA mensageiro (RNAm) e de proteínas. Este volume é freqüentemente chamado de domínio mionuclear (Cheek 1985). Muito tem sido discutido acerca da capacidade de expansão do domínio mionuclear de um mionúcleo através do aumento de síntese e eficiência no transporte de RNAm (Sinha-Hikim et al. 2003). Recentemente, Kadi et al. (2004) observaram que uma sobrecarga funcional no músculo pode gerar um aumento na atividade de células satélites promovendo mudanças na área da fibra muscular esquelética sem adição de novos mionúcleos. Nossos dados mostraram que as fibras dos grupos tratados com nandrolona tiveram área e número de mionúcleos maiores, corroborando as idéias propostas por Kadi et al. (1999b), que inferem que a adição de mionúcleos é uma condição prévia para a hipertrofia muscular amplificada. Parece que tanto a nandrolona e o metoprolol provocam um aumento do domínio mionuclear em fibras predominantemente de contração lenta. Resultados similares foram observados por Sinha-Hikim et al. (2003), nos

quais fibras de contração lenta apresentaram maior domínio mionuclear em usuários de testosterona quando comparados a não-usuários.

É considerado estado miopatológico quando mais de 3% das fibras contêm núcleos centrais (Greenfield 1957). Em nosso estudo, os animais tratados com nandrolona obtiveram valores muito maiores que os anteriormente mencionados (40% no sóleo e 12% no gastrocnêmio). Assim, como descreveram Eriksson et al. (2005) e Kadi et al. (1999b), a centralização de núcleos em fibras musculares poderia ser um fenômeno de adaptação a um estímulo ou sobrecarga. Os núcleos centrais poderiam existir para auxiliar fibras hipertróficas extremamente grandes, como ocorreu nos grupos tratados com nandrolona. Núcleos centrais poderiam reduzir as distâncias de difusão de um núcleo para partes centrais da fibra. Nossos resultados nos músculos sóleo e gastrocnêmio reforçam estas teorias.

É aceito que mionúcleos em fibras musculares maduras não são capazes de se dividirem (Allen 1999). A adição de células satélites aumentará o domínio mionuclear destas fibras (Morgan e Partridge 2003; Hawke e Garry, 2001). Embora não tenha sido analisado o número de células satélites em nosso estudo, os resultados obtidos sugerem que a administração de nandrolona em músculo esquelético ocasionou alteração nos padrões musculares devido ao aumento no número de células satélites (McClung et al. 2005). Um aumento significativo em número de células satélites foi observado em indivíduos jovens depois de suplementados com 300-600 mg de testosterona/semana durante 20 semanas (Sinha-Hikim et al. 2003).

A testosterona e os EAA exercem sua ação através do receptor de andrógeno, localizados nas regiões perinucleares e citosólicas do músculo estriado (Snochowski et al. 1980). A ligação do andrógeno resulta na ativação do DNA e transcrição de várias proteínas com diferentes atividades intracelulares (Dohle et al 2003). Estudos prévios informaram que ambos, testosterona e nandrolona podem aumentar a expressão de IGF-1 no músculo esquelético (Ferrando et al. 2002; Gayan-Ramirez et al. 2000; Lewis et al. 1999). Contudo, além da ativação de AR, os EAA exercem sua função por mecanismos paralelos

como o antagonismo competitivo do receptor de glicocorticóides (GR) (Mayer e Rosen, 1975). O antagonismo do GR é de interesse particular no estudo dos eventos hipertrofiantes já que o cortisol sinaliza o catabolismo muscular (Hasselgren, 1999; Price et al. 1996). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com nandrolona ocasionou alterações na expressão de AR, as quais foram refletidas na sua imunodeteção, ocasionando um aumento nos grupos tratados com nandrolona. O presente estudo demonstrou estar de acordo com o de Antonio et al. (1999) que descreveram que a expressão de AR é sensível à concentração circulante de testosterona. Porém, a influência dos níveis de testosterona circulantes na expressão de AR parece ser músculo-específico (Antonio et al. 1999). Músculos de contração lenta como o sóleo tendem a apresentar uma maior sensibilidade ao andrógeno quando comparados ao gastrocnêmio (contração rápida) e isto foi comprovado pelos maiores valores encontrados nos parâmetros morfométricos nos grupos tratados com nandrolona. No entanto, o tratamento com nandrolona apresentou mudanças na expressão de GR, a qual mostrou ser menor em relação aos grupos C e M. De forma contrária, animais controles apresentaram uma marcação deste receptor demonstrada tanto na região perinuclear quanto citosólica. Similarmente ao tratamento com nandrolona, animais tratados com metoprolol também apresentaram menores expressões de GR. Schmidt et al. (2001) demonstrou que os hormônios adrenérgicos aumentam a atividade de glicocorticóide no hipocampo. Dessa forma, pode ser que em nosso estudo, o bloqueio de receptores β -adrenérgicos provocado pelo tratamento com metoprolol levou a uma redução significativa na expressão de GR no músculo esquelético, a qual é dependente das concentrações circulantes de glicocorticóides.

Apesar do mecanismo de ação do metoprolol sobre o crescimento do músculo esquelético ainda ser pouco elucidado, o tratamento com metoprolol ocasiona mudanças no músculo estriado esquelético por bloqueio de receptores β_1 -adrenérgicos e isto poderia levar a um aumento da massa muscular com conseqüente aumento do domínio mionuclear. Receptores β -adrenérgicos podem estar envolvidos na manutenção ou na adaptação de características do tecido muscular esquelético. Por exemplo, foi sugerido que participam no

controle fisiológico da massa tecidual através de catecolaminas endógenas (Sillence et al. 1991). Há portanto, evidências que sugerem que a adaptação enzimática no músculo é regulada, pelo menos em parte, pela excitação de receptores β_2 -adrenérgicos (Ji et al. 1986). Além disso, a massa muscular esquelética, a concentração de proteínas e o tamanho da fibra muscular são aumentados após o tratamento com agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos (Kim e Sainz 1992; Murphy et al. 1996; Yang e McElligott 1989; Zeman et al. 1988). Se os receptores β_2 -adrenérgicos são necessários no músculo para a manutenção destas características, poderia ser esperado que o bloqueio crônico destes receptores β_1 -adrenérgicos defronte os efeitos encontrados em nosso estudo.

Neste presente estudo o metoprolol aumentou a massa muscular esquelética quando foi comparado com o grupo controle. Porém, estes resultados contradizem os de Sillence et al. (Sillence et al. 1991) e Benbachir-Lamrini et al. (1993), que informaram reduções na massa muscular esquelética de membros inferiores e aumentos na massa muscular do sóleo após tratamento crônico com um β -bloqueador (ICI), respectivamente. De forma interessante, Benbachir-Lamrini et al. (1993) observaram uma diminuição na AST do músculo de ratos Wistar-Kyoto normotensos em 4 semanas de idade, considerando que houve um aumento na AST com 8-10 semanas de idade. As razões para as diferenças observadas nestes estudos poderiam ser a duração do tratamento, a dose, a idade, o gênero, ou a tensão dos animais. Em outro estudo, foi demonstrado que o tratamento crônico com ICI não promoveu mudanças na massa muscular de ratos Sprague-Dawley (Murphy et al. 1997). Reduções na massa muscular esquelética após bloqueio crônico de receptores β_2 -adrenérgicos poderia resultar em diminuição das concentrações de proteínas musculares, já que a excitação destes receptores aumentam o conteúdo protéico no músculo esquelético (Yang e McElligott 1989). Neste estudo, mensuramos não só a massa magra dos músculos sóleo e gastrocnêmio, mas sim, de proteínas, aminoácidos e uma análise morfométrica seguida da expressão de receptores de andrógeno e glicocorticóide e todos estes parâmetros se apresentaram alterados após o tratamento com metoprolol e nandrolona. Estes

resultados sugerem que embora o tratamento com agonista de receptores β_2 -adrenérgicos possa promover a hipertrofia muscular esquelética (Kim e Sainz 1992; Yang e McElligott 1989), os receptores β_1 -adrenérgicos parecem não representar um papel obrigatório na manutenção do músculo nas condições presentes. De acordo com estudos de Sillence et al. (1995) e Murphy et al. (1997), é esperado que após um tratamento crônico com β -bloqueadores haja um aumento na expressão de receptores β_2 -adrenérgicos. Tal fato foi comprovado após 14 dias de tratamento com ICI, o qual aumentou a expressão destes receptores no músculo gastrocnêmio (42%) (Murphy et al. 1997). Portanto, nossos resultados nos permitem evidenciar que o tratamento com metoprolol por um efeito indireto pode ter ocasionado um aumento na expressão de receptores β -adrenérgicos os quais tem ligação com a manutenção e o ganho de massa muscular (Yang e McElligott 1989).

Considerando o que foi anteriormente mencionado, nossos resultados indicam que, enquanto o tratamento com nandrolona produz um aumento no tamanho da fibra e na proporção de tecido conjuntivo pela sua possível interação com receptores nucleares e de membrana (β -adrenérgicos) tanto no miocárdio, quanto no músculo esquelético, a sua associação com metoprolol ocasionou hipertrofia muscular esquelética, a qual era de se esperar já que este é um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos. Tal efeito encontrado foi similar àquele causado pela administração isolada de metoprolol, o que nos permite sugerir que um efeito competitivo prevaleceu sobre os potentes efeitos do EAA no músculo esquelético. No entanto, os mecanismos pelos quais o metoprolol aumentou o tamanho da fibra muscular esquelética e interferiu com a nandrolona quando associados, ainda devem ser investigados.

Em conclusão, altas doses de nandrolona promovem hipertrofia muscular estriada e aumento da matriz extracelular. A sua associação com metoprolol, apesar de promover um efeito cardioprotetor no ventrículo esquerdo, levou à hipertrofia dos músculos sóleo e gastrocnêmio. Contudo, um resultado competitivo inibitório foi observado sobre os efeitos hipertrofiantes da nandrolona nos animais estudados. Tais tratamentos modificaram a expressão de receptores

nucleares (AR e GR), o que provavelmente seja consequência às altas concentrações de testosterona sérica.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Laboratório de Bioquímica do Exercício e Saúde e membros do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, que contribuíram para a análise e interpretação dos dados.

Referências

Agati L, Fedele F, Penso M, Sciomer S, Dagianti A (1987) Left ventricular filling pattern in hypertensive patients after reversal of myocardial hypertrophy. *Int J Cardiol* 17:177-86.

Allen DL, Roy RR, Edgerton VR (1999) Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350–1360.

Antonio J, Wilson JD, George FW (1999) Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 87:2016–2019.

Baume N, Schumacher YO, Sottas PE, Bagutti C, Cauderay M, Mangin P, Saugy M (2006) Effect of multiple oral doses of androgenic anabolic steroids on endurance performance and serum indices of physical stress in healthy male subjects. *Eur J Appl Physiol* 98:329–340.

Benbachir-Lamrini L, Koubi H, Sempore B, Mayet MH, Frutoso J, Cottet-Emard JM, Favier RJ (1993) Soleus muscle alterations in spontaneously hypertensive

rats are not dependent on activation of β_2 -adrenergic receptors. *J. Auton. Nerv. Syst* 44:161–170.

Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM (1999) The Effect of Anabolic Steroids and Corticosteroids on Healing of Muscle Contusion Injury. *The American Journal of Sports Medicine* 27(1):2-9.

Bernardes-Amorim D, Manzoni MSJ, Souza C, Tenório N, Dâmaso, A (2004) Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras de Ed Física e Esporte* 18(2):191-200.

Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, et al (2001) Testosterone dose response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:1172-1181.

Bisschop A, Gayan-Ramirez G, Rollier H, Dekhuijzen P N, Dom R, de Bock V, Decramer M (1997) Effects of nandrolone decanoate on respiratory and peripheral muscles in male and female rats. *J. Appl. Physiol* 82:1112-1118.

Bitran D, Hilvers RJ, Frye CA, Erskine MS (1996). Chronic anabolic-androgenic steroid treatment affects brain GABA (A) receptor-gated chloride ion transport. *Life Sci* 57: 573-583.

Bolger AP, Al-Nasser F (2003) Beta-blockers for chronic heart failure: surviving longer but feeling better? *International Journal of Cardiology* 92:1–8.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brodsky IG, Balagopal P, Nair KS (1996) Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men—a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 81:3469–3475.

Buffum J (1986) Pharmacosexology update: prescription drugs and sexual function. *J Psychoactive Drugs* 18(2): 97-106.

Carson JA, Lee WJ, McClung J, Hand GA (2002) Steroid receptor concentration in aged rat hindlimb muscle: effect of anabolic steroid administration. *J Appl Physiol* 93:242–250.

Cheek DB (1985) The control of cell mass and replication. The DNA unit—a personal 20-year study. *Early Hum Dev* 12:211–239.

Chipuk JE, Cornelius SC, Pultz NJ, Jorgensen JS, Bonham MJ, Kim SJ, Danielpour D (2002) The androgen receptor represses transforming growth factor-signaling through interaction with Smad3. *J Biol Chem* 277:1240–1248.

Clark AS, Harrold EV, Fast AS (1997) Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav* 31:35–46.

Dohle GR, Smit M, Weber RFA (2003) Androgens and male fertility. *World J Urol* 21:341–345. doi: 10.1007/s00345-003-0365-9.

Dubowitz V, Brooke MH, Neville H (1972) *Muscle biopsy: a modern approach*. Saunders Co. Ltd, London.

Edgerton VR, Roy RR (1991) Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech* 24(Suppl 1):123–133.

Eriksson A (2006a) Strength training and anabolic steroids. A comparative study of the vastus lateralis, a thigh muscle and the trapezius, a shoulder muscle, of strength-trained athletes. Dissertation, Umeå University.

Eriksson A, Kadi F, Malm C, Thornell L (2005) Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* 124: 167–175.

Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell L (2006b) Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters; fiber splitting or defect regeneration? *Histochem Cell Biol* 126:409–417. doi: 10.1007/s00418-006-0176-3b.

Evans NA (2004) Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. *Am J Sports Med* 32:534. doi: 10.1177/0363546503262202.

Falanga V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, Yamaguchi Y (1998) Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. *J Invest Dermatol* 111:1193–1198.

Ferrando AA, Sheffield-Moore M et al (2002) Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 282(3):601–607.

Ferrando AA, Tipton KD, Doyle D, Phillips SM, Cortiella J, Wolfe RR (1998) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275:864-871.

Ferry A, Vignaud A, Noirez P, Bertucci W (2000) Respective effects of anabolic/androgenic steroids and physical exercise on isometric contractile properties of regenerating skeletal muscles in the rat. *Arch. Physiol. Biochem* 108:257–261.

Feuerstein G, Liu GL, Yue TL, Cheng HY, J. Hieble P, Arch JRS, Ruffolo Jr RR, Ma XL (1998) Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model *European Journal of Pharmacology* 351:341–350.

Gayan-Ramirez G, Rollier H, Vanderhoydonc F, Verhoeven G, Gosselink R, Decramer M (2000) Nandrolone decanoate does not enhance training effects but increases IGF-I mRNA in rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 88:26–34.

Gok HB, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S (2007) Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats *Journal of Clinical Neuroscience* 14:138–142.

Greenfield I (1957) Lead poisoning. X. Effects of lead absorption on the products of conception. *N Y State J Med* 57:4032–4034.

Griggs RC, Kingston W, Jozefowicz RF, Herr BE, Forbes G, Halliday D (1989) Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J. Appl. Physiol* 66:498–503.

Ji LL, Lennon DLF, Kochan RG, Nagle FJ, Lardy HA (1986) Enzymatic adaptation to physical training under β -blockade in the rat. Evidence of a β_2 -adrenergic mechanism in skeletal muscle. *J. Clin. Invest* 78:771–778.

Habib GB, Mann DL, Zoghbi WA (1994) Normalization of cardiac structure and function after regression of cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 128:333-343.

Hasselgren PO (1999) Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2:201–205.

Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91:534–551.

Joumaa WH, Leoty C (2001) Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc* 33:397–403.

Kadi F (2000) Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids. *Acta Physiol Scand Suppl* 646:1–52.

Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Thornell LE (1999b) Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 31:1528–1534.

Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL (2004) The Effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558:1005–1012.

Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ardekani FM, Mirkhani H (2007) The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. *Asian J Androl* 9(2):235–239. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2007.00203.x

Kelso TB, Shear CR, Max SR (1989) Enzymes of glutamine metabolism in inflammation associated with skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 257:885–894.

Kim YS, Sainz RD (1992) β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci* 50:397–407.

Kochakian CD (1959) Mechanisms of androgen actions. *Laboratory Investigation* 8:538-556.

Kuhn CM (2002) Anabolic Steroids. *Recent Prog Horm Res.* 57:411-434.

Lee WJ, McClung J, Hand GA, Carson JA (2003) Overload-induced androgen receptor expression in the aged rat hindlimb receiving nandrolona decanoate. *J Appl Physiol* 94:1153–1161.

Lewis MI, Fournier M, Yeh AY, Micevych PE, Sieck PM (1999) Alterations in diaphragm contractility after nandrolone administration: an analysis of potential mechanisms. *J Appl Physiol* 86:985–992.

Maravelias, AD, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicology Letters* 158:167–175. doi:10.1016/j.toxlet.2005.06.005.

Mayer M, Rosen F (1975) Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. *Am J Physiol* 229:1381–1386.

Messerli FH, Bell DSH, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Phillips RA, Raskin P, Wright Jr. JT, Bangalore S, Holdbrook FK, Lukas MA, Anderson KM, Bakris GL (2007) Investigators Body Weight Changes with β -Blocker Use: Results from GEMINI. *The American Journal of Medicine* 120:610-615

McClung JM, Mehl KA et al (2005) Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288(6):1543–1552.

Morgan JE, Partridge TA (2003) Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1151–1156.

Murphy, RJL, Béliveau L, Seburn KL, Gardiner PF (1996) Clenbuterol has a greater influence on untrained than on previously trained skeletal muscle in rats. *Eur. J. Appl. Physiol* 73:304–310.

Murphy RJL, Gardiner PF, Rousseau G, Bouvier M, Liveau L (1997) Chronic β -blockade increases skeletal muscle β -adrenergic receptor density and enhances contractile force. *J Appl Physiol* 83:459-465.

Neubauer M (1974) Hypertrophie des Myocards. Anaboler Effekt auf Herzmuskel. *Sexualmedizin* 11:599.

Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM (2005) High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS* 113:122–125.

Pavlović M, Tomašević M, Pešić LH, Marković V, Todorović L, Nikolić P, Apostolović S (1999) The influence of metoprolol on exercise training effects in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *Medicine and Biology* 6(1): 82–89.

Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE (2004) Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart* 90:473-475.

Price SR, Bailey JL, England BK (1996) Necessary but not sufficient: the role of glucocorticoids in the acidosis-induced increase in levels of mRNAs encoding proteins of the ATP-dependent proteolytic pathway in rat muscle. *Miner Electrolyte Metab* 22:72–75.

Rance NE, Max SR (1984) Modulation of the cytosolic androgen receptor in striated muscle by sex steroids. *Endocrinology* 115:862–866.

Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, and Flanders KC (2001) Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 120:43–47.

Saad PCB, Guimarães A, Dal Pai V, Kroll LB (2002) Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. *Rev Bras Med Esporte* 8:1-7.

Sachtleben TR, Berg KE, Elias BA, et al (1993) The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med Sci Sports Exerc* 25:1240-1245.

SBCAL (2009) Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. São Paulo, Brazil. <http://www.cobea.org.br/index.php>. Accessed in 15 Jan 2009.

Sharma AM, Pischon T, Hardt S, et al (2001) Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis. *Hypertension* 37:250-254.

Sillence MN, Matthews ML, Spiers WG, Pegg GG, Lindsay D B (1991) Effects of clenbuterol, ICI118551 and sotalol on the growth of cardiac and skeletal muscle and on β_2 -adrenoceptor density in female rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344:449–453.

Sillence MN, Matthews M L, Moore NG, Reich MM (1995) Effects of BRL-47672 on growth, β_2 -adrenoceptors, and adenylyl cyclase activation in female rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 268(31):159–167.

Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S (2002) Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:154–164.

Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S (2003) Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:197–205.

Snochowski M, Dahlberg E, Gustafsson JA (1980) Characterization and Quantification of the Androgen and Glucocorticoid Receptors in Cytosol from Rat Skeletal Muscle. *Eur. J. Biochem.* 111:603-616

Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T (2004) Endocrinological and pathological effects on anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocrine journal* 51(4):425-434.

Thompson RW, McClung JM, Baltgalvis KA, Davis JM, Carson JA (2006) Modulation of overload-induced inflammation by aging and anabolic steroid administration. *Experimental Gerontology* 41:1136–1148.

Trifunovic B, Norton GR, Duffield MJ, Avraam P, Woodiwiss AJ (1995) An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268:1096-1105.

Trimarco B, DeLuca N, Rosiello G (1989) Improvement of diastolic function after reversal of left ventricular hypertrophy induced by long-term antihypertensive treatment with tertatolol. *Am J Cardiol* 64:745-751.

Urban RJ, Bodenbun YH, Gilkison C, Foxworth J, Coggan AR, Wolfe RR, Ferrando A (1995) Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab* 32:820–826.

Urhausen A, Hoples R, Kindermann W (1989) One and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. *Eur J Appl Physiol* 58:633-640.

Venâncio DP, Tufik S, Garbuio SA, da Nóbrega ACL, de Mello MT (2008) Effects of anabolic androgenic steroids on sleep patterns of individuals practicing resistance exercise. *European journal of applied physiology* 102(5):555-560.

White WB, Schulman P, Karimedдини MK, Smith VE (1989) Regression of left ventricular mass is accompanied by rapid left ventricular filling following antihypertensive therapy with metoprolol. *Am Heart J* 117:145–150.

Wimalawansa SM, Chapa MT et al (1999) Reversal of weightlessness-induced musculoskeletal losses with androgens: quantification by MRI. *Journal of Applied Physiology* 86(6):1841–1846.

Woodiwiss AJ, Trifunovic B, Philippides M, Norton GR (2000) Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. *J. Appl. Physiol* 88:409–415.

Yang YT, McElligott MA (1989) Multiple actions of b-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J* 261:1–10.

Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD (1988) Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a b₂-receptor agonist. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 254(17):726–732.

Capítulo III

Esteróide anabolizante associado a antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos ocasiona alterações no sistema reprodutor de ratos wistar

Página de Título

Envio para a revista: *Reproduction - Society of Reproduction and Fertility*

Fator de Impacto: 2.916

EFEITO DA NANDROLONA E DO METOPROLOL NOS TESTÍCULOS DE RATOS

Leonardo Bruno Figueiredo¹, Miguel Maurício Diaz Gomez¹, Foued Salmen
Espíndola¹, Marcelo Emílio Beletti^{2*}.

¹Instituto de Genética e Bioquímica.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Av. Pará, 1720.CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brasil.

²Instituto de Ciências Biomédicas.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

*** Autor correspondente:**

Marcelo Emílio Beletti.

²Instituto de Ciências Biomédicas.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Av. Pará, 1720. Bloco 2B 1º. Andar. Campus Umuarama. CEP 38400-902. Tel 55
(34) 3218-2240. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: mebeletti@ufu.br.

Resumo

Investigaram-se os efeitos da associação de nandrolona e metoprolol no sistema reprodutor com enfoque nas alterações dos parâmetros morfológicos, dos níveis de testosterona sérica e das concentrações testiculares de proteína total, glutamato e glutamina. Quarenta ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos controle, tratados com metoprolol 1mg/kg/dia, nandrolona 20mg/kg/semana, e sua associação. Os testículos e espermatozóides foram processados histologicamente e analisados segundo os seguintes parâmetros: volume, peso, tamanho, diâmetro dos túbulos seminíferos, altura epitelial, luz tubular e proporção volumétrica. Imagens das cabeças de espermatozóides foram capturadas e avaliadas por sistema computacional para análise da diferença existente em sua estrutura e coloração. O tratamento com nandrolona provocou reduções nos parâmetros testiculares de peso, diâmetro e tamanho testicular como também de diâmetro dos túbulos seminíferos, altura epitelial, luz tubular e proporção volumétrica. Por outro lado, as concentrações séricas de testosterona, proteína total, glutamato e glutamina foram maiores nestes animais ($P < 0.05$). Os fatores descritos em testículos e espermatozóides indicam atrofia testicular com comprometimento da fertilidade, devido às alterações provocadas pelo feedback negativo do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal nestes animais. No entanto, as alterações causadas pela nandrolona foram menores quando analisadas em associação com metoprolol, indicando um possível efeito protetor do beta-bloqueador sobre os testículos.

Palavras-chave: nandrolona, testículos, espermatozóides, metoprolol, testosterona, morfometria.

Abstract

The effects of the association of nandrolone and metoprolol on the reproductive system, serum testosterone, total protein, and glutamate and glutamine concentrations of rats were investigated. Forty male Wistar rats were randomly distributed into 4 groups: control, treated with metoprolol 1mg/kg/day, treated with nandrolone 20mg/kg/week, and treated with both metoprolol and nandrolone. Testes and spermatozoa were histologically processed and analyzed to determine: volume, mass, size, width of the seminiferous tubules, epithelial height, tubular lumen, and volumetric proportion. Head images from spermatozoa were captured and analyzed by software to assess the difference between coloration and structure. Nandrolone treatment caused a decrease in mass, diameter and testicular size, as well as width of the seminiferous tubules, epithelial height, tubular lumen and volumetric proportion. On the other hand, serum testosterone, total protein and glutamine and glutamate concentrations were higher in these animals ($P < 0.05$). Metoprolol did not cause any significant effect on the morphological parameters investigated. The alterations caused by nandrolone were significantly lower when analyzed in association with metoprolol, which could indicate a possible protective effect of the beta-blocker on the testes.

Keywords: nandrolone, testes, spermatozoa, metoprolol, testosterone, morphometry.

Introdução

Esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são análogos sintéticos do hormônio sexual testosterona que aumentam a síntese protéica e o crescimento celular em diferentes tecidos. No macho, os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) regulam o crescimento testicular, a espermatogênese e a esteroidogênese (Rosenfeld 1972). O hormônio de liberação das gonadotrofinas hipotalâmico (GnRH) atua na hipófise anterior, promovendo a liberação de FSH, que estimula a gametogênese, bem como a liberação de LH que, por sua vez, estimula a síntese e a secreção de andrógenos (Hardman et al. 1996), os quais secretados pelas células de Leydig, atingem os túbulos seminíferos e a circulação (Wilson, 1996). A testosterona, a dihidrotestosterona e o estrogênio atuam no hipotálamo para exercer uma inibição da retroalimentação negativa no hormônio GnRH. Já que o GnRH estimula o FSH e o LH na pituitária, esta retroalimentação negativa pode ser vista pela inibição subsequente da produção de testosterona e efeito reverso sobre a espermatogênese (Rosenfeld 1972). O abuso de EAA tem sido associado a efeitos colaterais no sistema reprodutivo como atrofia testicular e espermatogênese prejudicada (Yesalis and Bahrke, 1995; Gruber and Pope, 2000; McGinnis, 2004; Payne et al., 2004; Schurmeyer et al., 1984; Pope and Katz, 1994; Wroblewska, 1997; Clark et al., 1997; Nagata et al., 1999; Torres-Calleja et al., 2001).

O metoprolol, um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos, é utilizado na prevenção secundária de infarto do miocárdio, como anti-hipertensivo e no tratamento de arritmias e hipertrofia cardíaca (Vujic et al.,

1997). Ainda que anti-hipertensivos possam causar deficiência significativa na função testicular, ocasionando infertilidade (Monoski et al., 2002; Thompson ST., 1994), agentes cardioseletivos como atenolol e metoprolol apresentam menores efeitos deletérios na função sexual (Monoski et al. 2002; Thompson ST., 1994; Buffum J., 1986).

Considerando os efeitos colaterais ocasionados por cada uma das drogas no sistema reprodutor, o presente estudo buscou avaliar a consequência da associação de nandrolona e metoprolol nos espermatozoides e testículos de ratos com enfoque nas alterações dos parâmetros morfológicos, nos níveis de testosterona sérica e nas concentrações testiculares de proteína total, glutamato e glutamina.

Resultados

Mensurações de parâmetros físicos e biométricos

A massa corporal inicial não foi diferente entre os grupos C, M, N e MN. No final do período experimental, o peso final e o ganho de peso corporal dos animais foram maiores para o grupo M, apresentando diferenças em relação aos demais grupos. No final do período experimental, os grupos M e MN apresentaram uma redução na massa corporal; contudo, nenhuma diferença foi observada entre os grupos N e MN. Apesar do grupo MN perder peso em relação ao C, este não se diferiu do grupo M. Quando analisado a percentagem de ganho de peso corporal, os grupos N e MN apresentaram maiores valores

que os grupos C e M (Tabela 1). De acordo com os dados de ingestão alimentar, os valores de todos os grupos apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey-Kramer em $P < 0,05$ (Tabela 1).

Tabela 1. Dados biométricos de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e associação de metoprolol e nandrolona.

Parâmetros	C	M	N	MN	P value
<i>Massa Corporal (g)</i>					
<i>Inicial</i>	294,3±21,7a	293,7±17,8a	294,3±22,1a	294,3±20,9a	0,9999
<i>Final</i>	395,4±29,7a	377,7±26,9 a	337,1±29,7 b	354,9±11,1 b	<0,0001
<i>Ganho</i>	101,1±15,9a	84,0±20,1a	42,8±12,9b	60,6±22,1b	<0,0001
<i>Ganho Percentual (%)</i>	74,4±3,0a	77,9±4,2ac	87,4±3,2b	82,9±6,1bc	<0,0001
<i>Ingestão Alimentar (g)</i>	25,3±0,5a	27,3±0,7b	32,1±0,4c	33,9±0,2d	<0,0001

Valores representados por média±desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 por grupo ou ($n=10$). Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Qualidade Espermática

Os valores de contagem, motilidade e vigor dos espermatozoides estão presentes na tabela 2. Animais tratados com nandrolona apresentaram redução nos três parâmetros. O metoprolol não ocasionou efeito sobre os parâmetros de contagem, motilidade e vigor. A associação de metoprolol com nandrolona reverteu o efeito negativo causado somente pela nandrolona (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros morfológicos dos espermatozoides de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e da associação entre metoprolol e nandrolona.

<i>Parâmetros</i>	<i>C</i>	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>MN</i>	<i>P value</i>
<i>Contagem Espermatozoides ($\times 10^6$ /mL)</i>	81,1 \pm 2,9a	77,0 \pm 2,0a	40,1 \pm 6,0b	76,0 \pm 2,7a	0,0028
<i>Motilidade (%)</i>	76,0 \pm 9,6a	72,8 \pm 17,9a	48,3 \pm 7,5b	68,7 \pm 15,5a	0,0030
<i>Vigor (0-5)</i>	4,0 \pm 0,5a	3,5 \pm 0,9a	2,3 \pm 0,7b	3,5 \pm 0,8a	0,0037

Valores representados por média \pm desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 por grupo ou ($n=10$). Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Em relação aos parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides, houve um aumento pronunciado na área no grupo tratado com nandrolona. A nandrolona e a sua associação com o metoprolol ocasionaram aumento nos valores de diferença percentual dos valores de pixels o qual reflete descompactação da cromatina. Porém, a administração com metoprolol promoveu uma redução nos mesmos. A análise do coeficiente de variação mostrou que animais tratados com nandrolona assim como sua associação com metoprolol provocaram seu aumento indicando heterogeneidade na compactação da cromatina (figura 1).

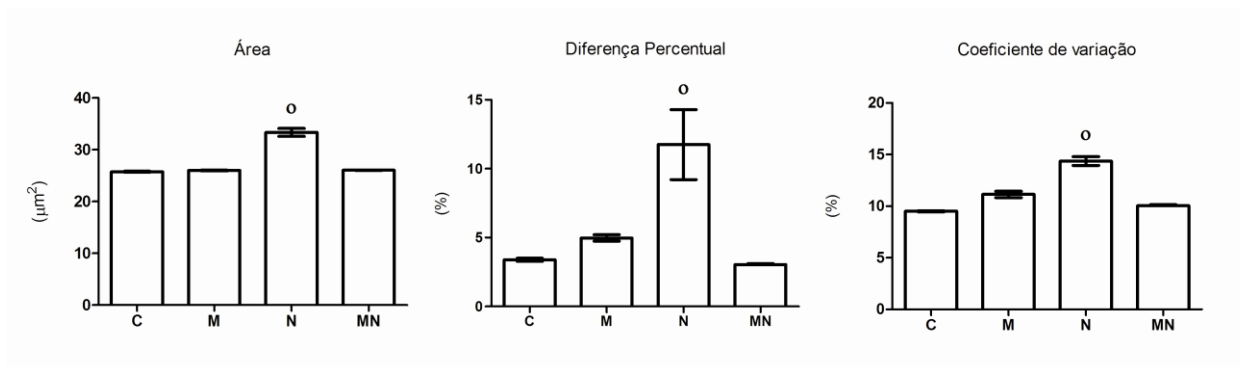


Figura 1. Análise da área, diferença percentual (condensação de cromatina) e coeficiente de variação (estrutura morfológica) (Média \pm Desvio-padrão da média) das cabeças dos espermatozóides de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e a sua associação ($^{\circ}$ P<0,0001).

Análise Testicular

A tabela 4 mostra os parâmetros biométricos (peso testicular, volume testicular, diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero, luz tubular, proporção volumétrica, percentual de tecido conjuntivo) e bioquímicos (proteína total, glutamato e glutamina) analisados em testículos dos animais. Os tratamentos provocaram uma diminuição no peso dos testículos, porém, somente a nandrolona e sua associação com o metoprolol causaram uma redução no seu volume e diâmetro. A administração ocasionou uma diminuição na altura do epitélio, luz tubular e proporção volumétrica e conseqüentemente aumento da proporção de tecido conjuntivo. A nandrolona e sua associação com metoprolol ocasionaram uma redução nos valores totais de proteínas assim como de glutamina e glutamato.

Tabela 3. Parâmetros biométricos, morfométricos e bioquímicos testiculares de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e com a associação entre metoprolol e nandrolona.

<i>Parâmetros</i>	C	M	N	MN	P value
<i>Peso dos testículos (g)</i>	1,91±0,09a	1,89±0,08ac	1,63±0,13b	1,78±0,01bc	<0,0001
<i>Volume dos testículos (mL)</i>	1,42±0,19a	1,37±0,10a	1,05±0,21b	1,20±0,11c	<0,0001
<i>Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)</i>	203,98±43,04a	198,70±32,25a	186,30±26,79b	193,31±38,16b	<0,0001
<i>Altura do epitélio seminífero (µm)</i>	65,12±15,17a	69,01±13,61a	63,30±10,14b	66,31±15,45a	<0,0001
<i>Luz tubular (Píxels)</i>	74,20±30,91a	68,07±35,13a	60,67±22,47b	69,51±32,30a	<0,0001
<i>Proporção volumétrica (%)</i>	59,92±12,84a	61,24±13,91a	54,54±10,29b	58,40±12,28a	0,0005
<i>Matriz Extracelular (%)</i>	6,04±2,56a	7,45±4,13a	9,92±4,83b	8,01±3,54a	0,0003
<i>Concentração de proteína total (µg/µL)</i>	4,96±0,57a	4,52±0,30a	3,89±0,12b	3,85±0,18b	<0,0001
<i>Glutamato</i>	1,32±0,08a	1,40±0,13a	1,17±0,06b	1,14±0,05b	<0,0001
<i>Glutamina</i>	1,35±0,10a	1,37±0,12a	1,13±0,09b	1,14±0,08b	<0,0001

Valores representados por média±desvio-padrão da média. Valores que compartilham a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer). Número de observações = 10 por grupo ou ($n=10$). Grupos controle (C), tratados com nandrolona (N), metoprolol (M) e combinação metoprolol e nandrolona (MN).

Testosterona total sérica

A análise das concentrações de testosterona sérica total revelou que existe diferença apenas nos grupos que receberam o decanoato de nandrolona, apresentando maiores concentrações de testosterona que os grupos controle e metoprolol (Figura 2).

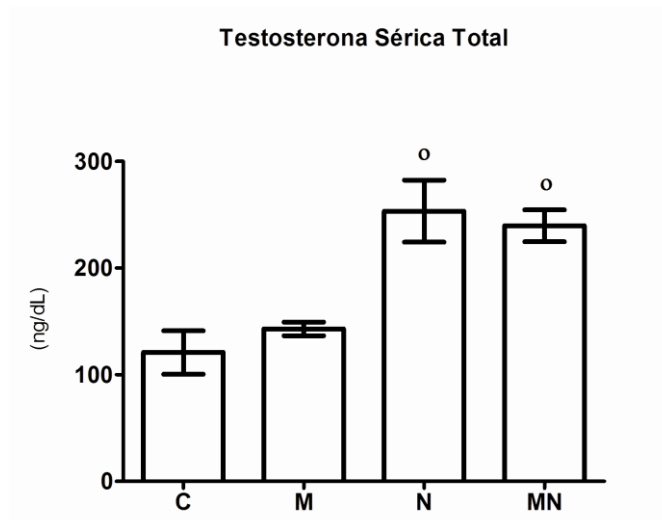


Figura 2. Concentração (Média±Desvio-padrão da média) de testosterona total sérica de ratos Wistar tratados com metoprolol, nandrolona e sua associação durante sete semanas. Níveis de testosterona apresentados em ng/dL mensurados por análise de quimioluminescência imunométrica ($^{\circ}P=0,0003$).

Discussão

Nossos resultados mostraram que sete semanas de tratamento com nandrolona (20mg/kg/semana) e sua associação com metoprolol tem efeito positivo na massa corporal. Outros estudos experimentais relataram resultados controversos na avaliação da massa corporal nos quais a maioria não relatou ganho (Beiner et al. 1999) devido à diminuição no apetite (Kochakian et al. 1959) e redução da expressão de receptor de andrógeno (Rance e Max, 1984). Os autores utilizaram doses de nandrolona similares àquelas que utilizamos neste estudo. Ainda que a massa magra não foi mensurada, outras variáveis como área e massa do músculo estriado esquelético (Eriksson et al. 2005; McClung et al. 2005) nos permitem sugerir que a nandrolona e sua associação com metoprolol causaram um incremento na massa corporal já que os animais não

foram submetidos a nenhum tipo de exercício físico ou atividade física e água e comida foram ofertadas *ad libitum* para todos os grupos ao longo do estudo.

Ainda que um ganho significativo foi observado na massa do músculo estriado (Eriksson et al. 2005; McClung et al. 2005), nos animais tratados com nandrolona e sua associação com metoprolol, devido em parte ao efeito anabólico de altas doses de testosterona neste tecido, uma atrofia testicular também foi observada em animais tratados com nandrolona. Tem sido sugerido que doses suprafisiológicas de EAA promovem tal efeito devido ao feedback negativo no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (Clark et al., 1997; Nagata et al., 1999; Pope e Katz., 1994; Schurmeyer et al., 1984; Torres-Calleja et al., 2001; Wroblewska A.M., 1997; Turek et al. 1995).

Além de utilizar os parâmetros de comprimento (Pope and Katz, 1994), largura (Koskinen et al. 1997) e volume testicular para determinar atrofia, tal como foi sugerido por Feinberg et al. (1997) e Noorafshan et al. (2005), a massa em gramas dos testículos dos animais tratados com nandrolona e sua associação com metoprolol também foi menor, sugerindo que estes dois grupos de animais apresentaram atrofia. Da mesma forma, os níveis de proteína total nos testículos, assim como as concentrações de glutamina e glutamato foram menores que no grupo controle. No entanto, os animais que receberam nandrolona associado com metoprolol não mostraram o mesmo efeito, indicando uma possível ação antagonista do metoprolol na atrofia testicular. Para nosso conhecimento, estudos mostrando o efeito da associação de metoprolol com nandrolona sobre os testículos não têm sido publicados.

Estudos anteriores também relataram dano aos testículos após altas doses de nandrolona como um menor número de células de Sertoli e de Leydig (Takahashi et al 2004 ; Bitran et al 1996). A análise dos nossos resultados mostrou que a nandrolona, mas não o metoprolol, teve impacto negativo na morfologia dos testículos e espermatozóides quando comparados com os animais controles. Nossos resultados são corroborados por outros estudos descrevendo o efeito da nandrolona em relação à redução do tamanho dos túbulos seminíferos, altura do epitélio e volume testicular (Feinberg et al 1997; and Noorafhan et al 2005; Mesbah et al. 2007). Alterações semelhantes na morfologia testicular podem ser claramente associadas com uma diminuição na qualidade espermática (Mesbah et al. 2007). Os animais tratados com nandrolona neste estudo, também mostraram menores valores de vigor, contagem espermática e motilidade quando comparados com os valores do grupo controle. Karbalay-Doust et al. (2007) demonstraram que tanto o tratamento com baixas (1mg/kg/dia) ou altas doses (10mg/kg/semana) de nandrolona, alteram a morfologia dos espermatozóides em ratos ainda que estas alterações sejam parcialmente reversíveis após 14 semanas de descontinuado o tratamento. Outros estudos (Holma P.K, 1977; Schurmeyer et al., 1984; Lukas S.E., 1993; Turek et al., 1995; Feinberg et al., 1997; Torres-Calleja et al., 2001) também relataram que EAA deterioram a espermatogênese ocasionando azoospermia e anormalidades morfológicas em espermatozóides de atletas. Conseqüentemente, é provável que doses suprafisiológicas de testosterona tenham resultado em uma redução na qualidade do espermatozóide devido a alterações morfológicas no testículo no presente estudo. Além disso, altas doses de

testosterona poderiam ser a causa das alterações na compactação da cromatina com implicações na capacidade de fertilização.

Em relação às concentrações séricas de testosterona, maiores valores foram observados nos dois grupos tratados com nandrolona. Estes resultados são um pouco ambíguos já que era de se esperar que uma atrofia testicular resultasse em menores níveis de produção de testosterona. Entretanto, consistentes com estes resultados são aqueles de Feinberg et al. (1997) e Noorafshan et al. (2005), que demonstraram que 10mg/kg/semana de propionato de testosterona resultaram em altos níveis de testosterona sérica e uma redução significativa nos parâmetros de comprimento dos túbulos seminíferos assim como no peso e volume dos testículos. Como mencionado anteriormente, altas doses de nandrolona podem provocar hipogonadismo devido ao feedback negativo do eixo HPA (Clark et al., 1997; Nagata et al., 1999; Pope e Katz., 1994; Schurmeyer et al., 1984; Torres-Calleja et al., 2001; Wroblewska A.M., 1997; Turek et al. 1995; Dohle et al. 2003). Inclusive com atrofia testicular (Pope and Brower, 2005; Pope e Katz, 1994), altos níveis de testosterona sérica parecem ser a consequência da administração de EAA. Takahashi et al. (2004) sugeriram que os altos níveis de testosterona sérica são o resultado da produção endógena e da administração de EAA. Por outro lado, resultados inconsistentes têm sido encontrados em humanos. Vários estudos anteriores relataram tanto baixas quanto altas concentrações de testosterona sérica após tratamento com EAA em fisiculturistas profissionais e amadores (Pope and Brower, 2005; Reyes-Fuentes and Veldhuis, 1993; Venancio et al. 2008). Nossos resultados mostraram um incremento de duas vezes na testosterona sérica após sete semanas de

tratamento com nandrolona. As diferenças encontradas entre os modelos animais e humanos podem ser atribuídos ao eixo HPA (Takahashi et al. 2004). Uma possível explicação para o menor volume e massa testicular dos ratos no presente estudo, é que mesmo com altos níveis de testosterona sérica, a concentração da mesma encontrada nos testículos não era apropriada para manter a espermatogênese resultando em atrofia (Dohle et al. 2003).

Resultados similares foram observados quando analisada a área, diferença percentual e coeficiente de variação das cabeças de espermatozóides de animais tratados com nandrolona e sua associação com metoprolol onde este parece ter reduzido os efeitos adversos causados somente pela nandrolona. Perreault et al. (1998) descreveram que o alto grau de compactação da cromatina espermática promove proteção e manutenção à integridade do DNA, tornando-o mais resistente a mutações e estresses ambientais, de tal modo que a fertilização do oócito e descondensação da cromatina possam ocorrer normalmente. Alterações na cromatina podem afetar a taxa de descondensação da mesma, fenômeno que parece ser espécie-específico podendo estar relacionado com o tipo de protamina presente e extensões das ligações dissulfeto. Falhas no complexo DNA-proteína podem ser investigadas utilizando a técnica de metacromasia induzida com azul de toluidina (Beletti et al. 2005). Nós avaliamos tais defeitos do complexo DNA-proteína através da coloração com azul de toluidina em vários parâmetros morfométricos das cabeças de espermatozóide de coelhos e touros (Beletti et al. 2005; Beletti e Mello, 2004). No entanto, em um estudo piloto encontramos que nem todos estes parâmetros são apropriados para ratos. Conseqüentemente, os parâmetros de área,

diferença percentual e coeficiente de variação foram utilizados no presente estudo. Assim como descrito por Belletti et al. (2005), a correlação negativa entre a diferença percentual, a área e coeficiente de variação mostram anormalidades na condensação da cromatina e no tamanho da cabeça dos espermatozoides. No presente estudo, animais tratados com nandrolona apresentaram danos na condensação da cromatina como comprovado por uma correlação entre os parâmetros anteriormente mencionados quando comparados aos controles.

Em conclusão, altas doses de nandrolona produziram atrofia testicular devido a uma redução do peso e volume testicular assim como do diâmetro dos túbulos seminíferos, altura epitelial, luz tubular e proporção volumétrica, com prejuízo na qualidade espermática demonstrada pelos valores reduzidos de área, diferença percentual e coeficiente de variação. Tais resultados se manifestaram como consequência do feedback negativo no eixo HPA. Ainda que a associação de nandrolona com metoprolol não tenha revertido a valores normais as variáveis estudadas, seu efeito foi significativamente reduzido nas mesmas.

Materiais e métodos

Ética

Todos os procedimentos de manejo, utilização e eutanásia destes animais seguiram criteriosamente as resoluções propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, 2009) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

Drogas e químicos

Deca-durabolin (ND – Decanoato de nandrolona 50mg/mL) e Seloken (MET - Tartarato de Metoprolol 5mg/mL) respectivamente foram adquiridas de Organon do Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil) e AstraZeneca (São Paulo, SP, Brasil).

Grupos experimentais

Ratos machos albinos da raça Wistar (*rattus norvegicus*) padrão específico patógeno livre (n=40), 60 dias de idade e peso médio de 300g, foram distribuídos aleatoriamente em: controle veículo-salina (grupo C, n=10), tratados com decanoato de nandrolona e salina (grupo N, n=10), tratados com tartarato de metoprolol e veículo (grupo M) (n=10), e tratados com decanoato de nandrolona e tartarato de metoprolol (grupo MN) (n=10).

Tratamentos

Foram realizadas aplicações intramusculares de 10mg/kg^{-1} de decanoato de nandrolona duas vezes por semana, durante sete semanas. Estudos anteriores demonstraram que o período de uma espermatogênese em ratos é de aproximadamente 48 a 56 dias (Kolasa et al. 2004) e que as doses usadas neste presente estudo são equivalentes às altas doses anteriormente utilizadas (Ferry et al. 2000; Gayan-Ramirez et al. 2000; Joumaa e Leoty. 2001; Karbalay-Doust et al. 2007). Também foi administrado intraperitonealmente, 1mg/kg/dia de tartarato de metoprolol (Feuerstein et al. 1998; Gok et al. 2007). Para simular o estresse induzido na aplicação das drogas, animais controles receberam respectivamente, injeções intramusculares profundas ou intraperitoneais de

veículo oleoso ou salina em frequências e volumes similares aos acima propostos (Thompson et al. 2006).

Condições ambientais de confinamento e nutrição dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura ambiente entre 22-25°C, em sala de controle de foto período 12/12h claro-escuro. Todos os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab, São Paulo, SP, Brasil) e água "ad libitum". A análise de ingestão alimentar seguiu os parâmetros de cálculo descritos por Bernardes et al., (2004) onde o consumo alimentar foi calculado através da diferença entre a ração ofertada e as sobras. Para o cálculo da evolução da massa corporal foi utilizada a seguinte fórmula: Delta ($\Delta\%$) = [(Massa final - Massa inicial / Massa inicial) X 100].

Procedimento anestésico e eutanásia

Ao final de sete semanas de tratamento, os animais foram pesados em balança analítica, anestesiados por aplicação intraperitoneal de xilazina e quetamina (9.9 mg/kg xylazine and 50 mg/kg ketamine) e sacrificados por decapitação em guilhotina.

Qualidade espermática

O procedimento para obtenção e análise do sêmen como contagem, vigor e motilidade dos espermatozóides, determinados por exame em microscópio óptico, foi realizado de acordo com o descrito anteriormente por Seed et al. (1996). Foram usadas amostras de espermatozóides obtidas da parte distal da cauda do epidídimo. Os espermatozóides foram colocados em microtubos

contendo uma alíquota do tampão Hank's Balanced Salt Solution (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5,5mM Glucose) e suavemente agitados à 37°C por 15 min (Karbaly-Doust et al. 2007).

Contagem, motilidade e vigor dos espermatozóides

Para a contagem dos espermatozóides, as amostras, diluídas no tampão, foram novamente diluídas em formolaldeído (1:10 v/v) (1:50), colocadas em uma câmara de Neubauer e as cabeças foram contadas manualmente utilizando um microscópio óptico. Foram contadas as cabeças presentes em cinco quadrantes em cada animal (Seed et al. 1996). A avaliação da motilidade foi feita classificando os espermatozóides em imóveis e móveis em uma escala de 0-100% (Parente R., 1994). Alíquotas da suspensão preparada de espermatozóides foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico (objetiva de 40x). A taxa da fração de espermatozóides móveis foi definida como o número de espermatozóides móveis \times 100/número total de espermatozóides (Seed et al. 1996). A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (*vigor*) foi realizada em microscópio óptico em aumento de 100 vezes, atribuindo valores na escala de 0 a 5, para o mínimo e máximo observado, respectivamente (Seed et al. 1996; Parente R., 1994).

Análises morfológicas dos espermatozóides

Para a avaliação morfológica, esfregaços de espermatozóides foram fixadas em etanol e ácido acético rotinariamente (Beletti e Mello, 1996). O método de metacromasia foi utilizado como descrito anteriormente (Beletti et al.

2005). Brevemente, as amostras foram hidrolisadas em 4M HCl, lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. Uma alíquota de azul de toluidina (25mg/L) diluída em tampão Mc Ivaine (0,1M Ácido Cítrico e 0,2M Na₂HPO₄ pH 4,0) foi colocada nas amostras entre lâminas e lamínulas. Cinquenta imagens digitais que foram usadas na segmentação de 100 cabeças de espermatozóides foram utilizadas na análise estrutural da cabeça de espermatozóides. Foi mensurado um total de 1.000 cabeças por grupo. Posteriormente, foram avaliadas nas cabeças dos espermatozóides as seguintes características morfométricas: área, diferença percentual dos valores de píxels da cabeça analisada em relação a 10 cabeças padrões e coeficiente de variação dos valores de píxels de cada cabeça (Beletti et al. 2005).

Análise testicular

Após eutanásia dos animais, os testículos foram removidos e pesados. O peso relativo e volume foram mensurados. Para análise morfométrica, o testículo direito de cada animal foi fixado em solução formalina tamponada (1:9 v/v) (Tampão salina fosfato 0,1M, pH 7.4). Amostras depois de incluídas em parafina foram desidratadas e diafanizadas rotineiramente. Secções de (5µm) foram cortadas em micrótomo rotativo e coradas com hematoxilina e eosina e picrosírius red. Posteriormente, 500 túbulos seminíferos foram fotografados utilizando microscópio de luz (Olympus America Inc., Germany) em uma objetiva de 10x conectado a um sistema de captura e análise de imagens computadorizado. As imagens foram analisadas utilizando o software HLImage 97 (Western Vision Software, Layton, Utah, USA). Tais procedimentos foram realizados para avaliação do diâmetro dos túbulos seminíferos, altura dos

epitélios, luz do túbulo, proporção volumétrica e proporção de tecido conjuntivo (matriz extracelular) presente nos testículos. O diâmetro da luz tubular foi encontrado pela diferença entre a média do diâmetro do túbulo seminífero (μm) e a média da altura epitelial multiplicado por dois (μm). A proporção volumétrica foi achada pela diferença entre a área total da imagem (em pixels) subtraída pela área ocupada pelos túbulos seminíferos. A quantificação de tecido conjuntivo foi realizada pela análise do percentual de área de depósito do corante picrossírius red no tecido sobre a área total da imagem capturada.

Análises de testosterona sérica

Para análise de testosterona sérica total, amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca. Uma alíquota de soro foi congelada à -20°C para análise. Testosterona foi mensurada por ensaio imunométrico de quimioluminescência (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA). Os limiares de detecção para testosterona foram de 10 ng/dL (Ortho-Clinical Diagnostics Inc., Amersham, England) (Baume et al. 2006; Venancio et al. 2008).

Dosagem de proteína total, glutamina e glutamato

Para dosagem de proteínas totais, frações dos testículos dos animais foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em pistilo e armazenadas em -80°C . Posteriormente, foram homogeneizadas em homogeneizador elétrico utilizando soluções geladas e extraído exatamente 100 mg/mL, de tecido congelado a -80°C em tampão de extração (HEPES 40 mM pH 7.7, EDTA 10 mM, EGTA 2mM, DTT 2 mM e Benzamidina 1 mM). Proteína total presente no homogeneizado foi então dosada pelo método de Bradford,

(1976). Para a análise de glutamina e glutamato, o homogeneizado foi centrifugado a 14.000g por dois minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente removido e aliquoteado. A dosagem do sobrenadante foi realizada em analisador bioquímico (YSI 2700. Yellow Springs, Ohio, USA).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média±desvio-padrão da média (DPM). Os dados foram comparados através da análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey-Kramer foi utilizado para verificar as diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

Financiamento

Este trabalho foi fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular assim como aos do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para a análise e interpretação dos dados.

Referências

Baume N, Schumacher YO, Sottas PE, Bagutti C, Cauderay M, Mangin P & Saugy M 2006 Effect of multiple oral doses of androgenic anabolic steroids on endurance performance and serum indices of physical stress in healthy male subjects. *Eur J Appl Physiol* **98** 329–340.

Beletti ME, Costa LF & Guardieiro MM 2005 Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J morphol Sci* **22(2)** 85-90.

Beletti ME & Mello MLS 1996 Methodological variants contributing to detection abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Genetics* **19** 97-103.

Beletti ME & Mello MLS 2004 Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*. **62** 398-402.

Bernardes-amorim D, Manzoni, MSJ, Souza C, Tenorio N & Damaso A 2004 Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte* **18** 191-200.

Bitran D, Hilvers RJ, Frye CA & Erskine MS 1996 Chronic anabolic-androgenic steroid treatment affects brain GABA (A) receptor-gated chloride ion transport. *Life Sci* **57** 573-583.

Bradford MM 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248-254.

Buffum J 1986 Pharmacosexology update: prescription drugs and sexual function. *J Psychoactive Drugs* **18(2)** 97-106.

Clark AS, Harrold EV & Fast AS 1997 Anabolic-androgenic steroid on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav* **31** 35–46.

Eriksson A, Kadi F, Malm C & Thornell L 2005 Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* **124** 167–175.

Dohle GR, Smit M & Weber RF 2003 Androgens and male fertility. *World J Urol* **21** 341–5.

Feinberg MJ, Lumia AR & McGinnis MY 1997 The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav* **62** 23–30.

Ferry A, Vignaud A, Noirez P & Bertucci W 2000 Respective effects of anabolic/androgenic steroids and physical exercise on isometric contractile properties of regenerating skeletal muscles in the rat. *Arch Physiol Biochem* **108** 257–61.

Feuerstein G, Liu GL, Yue TL, Cheng HY, J. Hieble P, Arch JRS, Ruffolo Jr RR & Ma XL 1998 Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model. *European Journal of Pharmacology* **351** 341–350.

Gayan-Ramirez G, Rollier H, Vanderhoydonc F, Verhoeven G, Gosselink R & Decramer M 2000 Nandrolone decanoate does not enhance training effects but increases IGF-I mRNA in rat diaphragm. *J Appl Physiol* **88** 26–34.

Gok HB, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E & Palaoglu S 2007 Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience* **14** 138–142.

Gruber AJ & Pope Jr HG 2000 Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother Psychosom* **69** 19–26.

Hardman JG, Gilman AG, Linbird LE & Editors 1996 Godman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. *New York: McGraw-Hill Book Co.*

Holma PK 1977 Effects of an anabolic steroid (metandienone) on spermatogenesis. *Contraception* **15** 151–62.

Joumaa WH & Leoty C 2001 Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscles. *Med Sci Sports Exerc* **33** 397–403.

Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Mesbah F & Mirkhani H 2007 The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. *Asian J Androl* **9(2)** 235–239.

Kochakian CD 1959 Mechanisms of androgen actions. *Laboratory Investigation*. **8** 538–556.

Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rozewicka L & Wiszniewska B 2004 Morphology of the testis and the epididymis in rats with dihydrotestosterone (DHT) deficiency. *Rocz Akad Med Bialymst* **49** 117–9.

Koskinen E, Andersson M & Katila T 1997 Effect of 19-norandrostenediolylaurate on testicular growth in colts. *Acta Vet Scand* **38** 51–7.

Lukas SE 1993 Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol Sci* **14** 61–8.

McClung JM, Mehl KA, Thompson RW, Lowe LL & Carson JA 2005 Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded

rat soleus muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288 (6)** 1543–1552.

McGinnis MY 2004 Anabolic androgenic steroids and aggression: studies using animal models. *Ann N Y Acad Sci* **1036** 399-415.

Mesbah SF, Shokri S, Karbalay-Doust S, Mirkhani H 2007 The Effect of Nandrolone Decanoate on the Body, Testis and Epididymis Weight and Semen Parameters in Adult Male Rats. *IJMS* **32 (2)** 93-99.

Monoski M, Nudell DM & Lipshultz LI 2002 Effects of medical therapy, alcohol, and smoking on male fertility. *Contemporary Urology* **June** 57-63.

Nagata S, Kurosawa M, Mima K, Nambo Y, Fujii Y, Watanabe G & Taya K 1999 Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormones in the stallion. *J Reprod Fertil* **115** 373–9.

Noorafshan A, Karbalay-Doust S & Ardekani FM 2005 High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS* **113** 122–5.

Parente R, Melloti C, Zacchini A, Di Stasio D & Poli A 1994 Indagini seminologiche per la valutazione del potenziale di fertilit`a. *Analysis* **1** 22–23.

Payne JR, Kotwinski PJ & Montgomery HE 2004 Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart* **90** 473-5.

Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM & Keefer CL 1988 Interspecies differences in the satability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vivo by flow cytometry. *Biology of Reproduction* **39**157-167.

Pope HG & Brower KJ 2005 Anabolic-Androgenic Steroids Abuse, in *Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Vol 1 pp 1318-1328 Edited by Sadock BJ, Sadock VA. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Pope HG Jr & Katz DL 1994 Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry* **51** 375–82.

Thompson RW, McClung JM, Baltgalvis KA, Davis JM & Carson JA 2006 Modulation of overload-induced inflammation by aging and anabolic steroid administration. *Experimental Gerontology* **41** 1136–1148.

Rance NE & MAX SR 1984 Modulation of the cytosolic androgen receptor in striated muscle by sex steroids. *Endocrinology* **115** 862– 866.

Reyes-Fuentes A & Veldhuis JD 1993 Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **22(1)** 93-124.

Rosenfeld RL 1972 Role of androgens in growth and development of the fetus, child, and adolescent. *Adv Pediatr.* 19.

SBCAL 2009 Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. São Paulo, Brazil. <http://www.cobea.org.br/index.php>. Accessed in 15 Jan 2009.

Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DNR & Wise LD 1996 Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* **10** 237–44.

Schurmeyer T, Knuth UA, Belkien L & Nieschlag E 1984 Reversible azoospermia induced by the anabolic steroid 19-nortestosterone. *Lancet* **1** 417–20.

Takahashi M, Tatsugi Y & Kohno T 2004 Endocrinological and pathological effects on anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocrine journal* **51(4)** 425-434.

Torres-Calleja J, Gonzalez-Unzaga M, DeCelis-Carrillo R, Calzada-Sanchez L & Pedron N 2001 Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. *Life Sci* **68** 1769–74.

Thompson ST 1994 Prevention of male infertility: an update. *Phenothiazines* **21(3)** 365-76.

Turek PJ, Williams RH, Gilbaugh JH 3rd & Lipshultz LI 1995 The reversibility of anabolic steroid-induced azoospermia. *J Urol* **153** 1628–30.

Wilson JD 1996 Androgens In: GILMAN AG, RALL TW, NIES AS & TAYLOR P. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Singapore, McGraw-Hill Book Co. 9:1441-57.

Wroblewska AM 1997 Androgenic-anabolic steroids and body dysmorphia in young men. *J Psychosom Res* **42** 225–34.

Venâncio DP, Tufik S, Garbuio SA, da Nóbrega ACL & de Mello MT 2008 Effects of anabolic androgenic steroids on sleep patterns of individuals practicing resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **102** 555–560.

Yesalis CE & Bahrke MS 1995 Anabolic-androgenic steroids. *Sports Med.* **19** 326-40.

Z. Vujic, D. Radulovic & D. Agbaba 1997 Densitometric determination of metoprolol tartrate in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15** 581-585.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)