



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

Efeito do estanozolol sobre a fertilidade em ratas pré-púberes

Recife – 2013

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

Efeito do estanozolol sobre a fertilidade em ratas pré-púberes

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal. Área de Concentração em
Morfofisiologia Animal**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Recife - 2013

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

“EFEITO DO ESTANOZOLOL SOBRE A FERTILIDADE EM RATAS PRÉ-PÚBERES”

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal

Aprovada em de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves – LIKA/CPqAM

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Newton e Simone, por todo amor e incentivo dado durante toda a minha vida. Obrigado pelo amor incondicional, pela força e segurança fazendo com que eu sempre acreditasse nos meus objetivos. Amo vocês!

À minha sobrinha, Kamilly Victória, por me inspirar, ouvir e iluminar meus dias com seu doce sorriso;

Aos meus orientadores, Álvaro Águiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira pela orientação dedicada, desde a época da graduação. Obrigada pela confiança e ensinamentos, que tem sido preciosos para minha formação acadêmica, profissional e pessoal;

À Carina Scanoni pela motivação e exemplo de profissional. Despertando em mim a paixão pela disciplina de histologia e procurar as pessoas certas para ingressar na pesquisa;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade e concessão do local para a realização deste trabalho; À CAPES pela concessão da bolsa;

A Leucio Duarte Vieira por toda ajuda, disponibilidade, dedicação e boa vontade na realização do Western blott. Você é um exemplo de profissional! A Ana Durce Oliveira da Paixão por ter permitido a execução de tal metodologia em seu Laboratório;

Aos amigos: Aline Maria, Arnaldo Guilherme, Débora Félix, Erinaldo Ferreira, Felipe Gomes, Gabriela Barbosa, Gledson Batista, Jaciel Oliveira, Jemima Leite, Ricardo Tibúrcio e tantos outros por toda amizade e torcida. Obrigada por todas as vezes que vocês ouviram meus estresses e alegrias. Vocês são essenciais em minha vida!

Aos amigos do Laboratório de Histologia por toda alegria, ajuda e apoio, deixando os dias rotineiros mais felizes. À Fernanda Angelo, Ismaela Melo, Jeanine Martins e Solange Bezerra pela ajuda em algumas metodologias. À Gyl Everson, Franklin Magliano, Clóvis Lapa e Thiago Souza por sempre me apersearem e me tirarem bons risos.

As amigas da Pós-Graduação: Danielle Dutra, Fabiana Felix, Juliana Arandas, Sandra Souza, Veruska Alexandrino, vocês foram mais que colegas de turma, se tornaram grandes amigas. Obrigado por cada momento compartilhado, cada sorriso, cada lágrima, cada estresse. A jornada se tornou mais doce por ter vocês por perto;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O uso indiscriminado de esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) vem fazendo parte da rotina de jovens e praticantes de atividade física, principalmente em academias ou centro de práticas esportivas. O que antes era restrito apenas para o público masculino, tem alcançado também o público feminino. Esse uso tem resultado em uma série de efeitos colaterais indesejáveis em mulheres adultas, no entanto, os efeitos fisiológicos do abuso destes por adolescentes do sexo feminino no início da puberdade são ainda desconhecidos, e não há estudo de que os possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva. Assim, a presente pesquisa analisou o efeito do estanozolol administrado em ratas pré-púberes sobre a fertilidade através dos seguintes parâmetros: ciclicidade estral, abertura vaginal, hormônios sexuais, receptores de estrógenos, número de sítios de implantação, histologia ovariana e placentária, além do peso e angiogênese nesses órgãos. Foram utilizadas 20 ratas albinas, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: ratas pré-púberes tratadas com óleo de gergelim (GI) e ratas pré-púberes tratadas com estanozolol (GII), administrado em uma única injeção s.c. de 5mg/Kg em óleo de gergelim (1mL/kg) como veículo, no vigésimo primeiro dia após nascimento. Os resultados mostraram que o estanozolol mesmo administrado em dose muito baixa e numa única vez promoveu abertura vaginal precocemente, aumento significativo na frequência das fases de proestro e estro e declínio das fases de metaestro e diestro, elevação dos níveis estrogênicos e redução dos níveis progestagênicos, redução da expressão do receptor- α estrogênico nos ovários, redução do número de sítios de implantação, aumento do peso ovariano e placentário, além da maior expressão do VEGF placentário e ovariano. Assim, conclui-se que o estanozolol administrado antes da puberdade atua como um desregulador endócrino da reprodução em ratas.

PALAVRAS-CHAVE: Anabolizantes, reprodução, receptores, angiogênese, roedores

ABSTRACT

The indiscriminate use of anabolic androgenic steroids (AAS) has becoming part of young and practitioners of physical activities' daily life, especially at gyms and other places where people practice some exercise. First, It had only male users. It also has reached a female audience. Some unwanted collateral effects in adult women are result from the AAS using, however, the physiological effects caused by the indiscriminate use of AAS by female adolescents in the puberty beginning are still unknown, and there's no study about the permanency of possible effects on the reproductive life. Thus, this study analyzed the stanozolol effect in prepubertal female rats on fertility using the following parameters: estrous cyclicity, vaginal opening, sex hormones and their receptors, implantation sites number, ovarian and placental histology, besides the weight and angiogenesis and these organs. 20 female albino rats were used, and they were submitted to the following treatments: Control group - prepubertal female rats sesame oil treated and Stanozolol group - prepubertal female rats stanozolol treated, the stanozolol was used in an only subcutaneous injection 5mg/Kg with sesame oil 1mL/kg as vehicle, in the twenty-first day after birth. Results showed that even used in low quantities and only once stanozolol promoted an earlier vaginal opening, significant increase in the proestrus and estrus frequency and decline in the metestrous and diestrus, an estrogenic levels increase and reduction of progestagen levels, expression decrease from estrogen alpha receptor in the ovaries, reduction of implantation sites, ovarian and placental weight increase, besides the ovarian and placental VEGF higher expression. Therefore, the study concluded that the prepubertal stanozolol using acts as an endocrine disruptor on rats reproduction.

KEY-WORDS: Anabolics, reproduction, receptors, angiogenesis, prepubertal female rats.

SUMÁRIO

| Capítulos | | Pág. |
|-----------|---|------|
| 1 | 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| | 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| | 2.1. Esteróides anabólicos androgênicos..... | 15 |
| | 2.2. Mecanismo de ação dos EAA..... | 16 |
| | 2.3. Uso terapêutico dos EAA..... | 17 |
| | 2.4. Uso indiscriminado dos EAA..... | 18 |
| | 2.5. Estanozolol..... | 19 |
| | 2.6. Anabolizantes e reprodução..... | 21 |
| | 2.8. Hormônios esteroides e seus receptores..... | 23 |
| | 2.9. Desenvolvimento placentário..... | 24 |
| | 2.10. Angiogênese..... | 26 |
| | 2.11. Angiogênese ovariana e placentária..... | 28 |
| | 3. REFERÊNCIAS..... | 31 |
| 2 | Efeito da administração do estanozolol em ratas pré-púberes, sobre a fertilidade, níveis hormonais e angiogênese..... | 40 |
| | Resumo..... | 40 |
| | Introdução..... | 41 |
| | Material e métodos..... | 43 |
| | Resultados..... | 47 |
| | Discussão..... | 49 |
| | Conclusão..... | 53 |
| | Referências..... | 53 |

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1. Modificações estruturais na molécula de testosterona para formação de esteroides anabólicos androgênicos (Wu, 1997)..... 16

FIGURA 2. Mecanismo de ação dos esteroides anabólicos androgênicos (Garrett; Grisham, 1995)..... 17

FIGURA 3: Formula química do estanozolol (Espírito Santo, 2006)..... 20

FIGURA 4: Angiogênese: Processo de formação de novos vasos sanguíneos (Hendrix et al., 2003)..... 26

FIGURA 5: Representação esquemática dos ligantes da família VEGF e seus receptores (Modificado de Capp et al., 2009)..... 28

CAPITULO II

FIGURA 1. Média, em dias, do período de abertura vaginal nas fêmeas dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$). 57

FIGURA 2. Média do percentual das fases do ciclo estral das fêmeas dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$)..... 57

FIGURA 3. Sítio de implantação (*) de ratas do grupo controle (A) e tratado com estanozolol (B). (C) – Grupo controle: trofoblastos volumosos (setas pretas) e em mitose (ponta de seta), além de citotrofoblasto poliplóide (setas longas). (D) - Grupo estanozolol: observar trofoblastos pouco volumosos (setas brancas). (D) - Disco placentário de rata do grupo controle: labirinto (L) trofospongio (T) e Célula trofoblástica gigante (Ctg). (F) – Grupo estanozolol: Camada de células trofoblásticas gigantes (CTg). Coloração H.E..... 59

FIGURA 4. Ovários de ratas: (A) Grupo controle: Grande quantidade de corpos lúteos (cl) e poucos folículos ovarianos (setas). (B) Grupo tratado com estanozolol: pouca quantidade de corpos lúteos (cl) e vários folículos ovarianos (setas). Coloração H.E. Imunohistoquímica de receptores de estrógeno nos ovários: (C) Grupo controle: Observar forte marcação nos corpos lúteos (cl). (D) – Grupo tratado com estanozolol: Fraca marcação nos corpos lúteos..... 60

FIGURA 5. Análise das proteínas VEGF no ovário de ratas controle e tratadas com estanozolol. (A) Blots ilustrativos e gráficos representando o conteúdo VEGF expresso em UA/50 µG de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total de VEGF em UA/g de tecido. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos..... 61

FIGURA 6: Análise das proteínas VEGF na placenta de ratas controle e tratadas com estanozolol. (A) Blots ilustrativos e gráficos representando o conteúdo VEGF expresso em UA/50 µG de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total de VEGF em UA/g de tecido. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos..... 62

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Lista dos EAA mais consumidos nos EUA (National Institute on Drug Abuse- Nida, 2001)..... | 20 |
|--|----|

CAPITULO II

| | |
|---|----|
| TABELA 1. Médias e desvio padrão dos níveis séricos (ng/mL) de estradiol e progesterona nas fêmeas com 30 e 60 dias de nascidas..... | 58 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| TABELA 2. Médias e desvio padrão do número de sítios de implantação e peso das placentas e ovários nos grupos experimentais..... | 58 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-1 – Angiopoetina 1

Ang-2 – Angiopoetina 2

ANGPT – Sistema angiopoetina

AR – Receptor androgênico

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

CTG - Célula trofoblástica gigante

DHEA - Desidroepiandrosterona

DHT - Dihidrotestosterona

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

EAA - Esteróide anabólico androgênico

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESR - Gene do receptor de estrogênio

EST – Estanozolol

FGF2 - Fator de crescimento de fibroblastos 2

FGFb – Fator de crescimento de fibroblasto básico

FSH - Hormônio folículo estimulante

Flt-1 - Receptor 1 do fator endotelial vascular

Flk-1- Receptor 2 do fator endotelial vascular

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

HCG - Gonadotrofina coriônica humana

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

LHRH - Hormônio de liberação luteinizante

LH - Hormônio luteinizante

MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano

PDGF - Fatores de crescimento derivados de plaquetas

PN - Pós-natal

RE α - Receptor de estrogênio subtipo α

RE β - Receptor de estrogênio subtipo β

RNA m – RNA mensageiro

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Uma dos aspectos que tem caracterizado a sociedade de consumo contemporânea é a grande importância dada à aparência corporal. Nas últimas décadas, o corpo tornou-se alvo de uma atenção redobrada com a proliferação de técnicas de cuidado e gerenciamento, tais como dietas, musculação e cirurgias estéticas. Com isso, é notório o aumento do consumo das chamadas "drogas da imagem corporal", entre as quais se incluem os esteroides anabólicos androgênicos ou anabolizantes (KANAYAMA; POPE; HUDSON, 2001).

Esteroides anabólicos androgênicos (EAA) é uma família de hormônios que incluem a testosterona e seus derivados sintéticos, os quais possuem tanto efeitos anabólicos quanto androgênicos. Assim, estimulam o crescimento muscular e a função do sistema reprodutor masculino através de suas propriedades farmacocinéticas, biodisponibilidade e balanço entre suas atividades androgênicas e anabólicas (MARQUES; PEREIRA; NETO, 2003; KANAYAMA, HUDSON; POPE, 2008).

Clinicamente, os androgênios são indicados em algumas terapêuticas de hipogonadismo e castração; tumores mamários; osteoporose; controle de menopausa e andropausa. Porém, dependendo da proporção entre droga utilizada, tempo e quantidade, os riscos do uso de um esteroide podem ser irreversíveis, podendo causar uma série de efeitos colaterais (COCOLO, 2002). Dentre eles, os mais comuns são acne, atrofia testicular, retenção hídrica, alterações do humor e ginecomastia (HARTGENS; KUIPERS, 2004; PARKINSON; EVANS, 2006).

Mesmo diante de tais efeitos colaterais, o uso dessas substâncias não só aumentou notavelmente nessas últimas cinco décadas como atingiram outras populações. A alta incidência de uso de esteroides anabólicos tem sido encontrada não só em atletas de competição, como também em atletas recreacionais e mulheres que o utilizam para fins estéticos, visando o aumento da massa magra e a redução da gordura subcutânea (POPE; KATZ, 2004).

Entre os esteroides anabólicos androgênicos mais conhecidos, encontramos o estanozolol. O estanozolol (17 β -hidroxi-17-metil-5 α -androstano [3,2-c] pirazol) está incluído no grupo dos esteroides anabolizantes aromatizantes. Esse anabolizante é utilizado na medicina no tratamento auxiliar de várias doenças, como na endometriose, no estímulo da eritropoiese em algumas anemias, na aceleração da cicatrização em grandes traumas ou cirurgias, na sarcopenia em pacientes com HIV e na terapia do hipogonadismo masculino. Atletas também utilizam o estanozolol, em altas doses, com objetivo de melhorar o desempenho físico (FALANGA et al., 1998; BEUTEL; BERGAMASCHI; CAMPOS, 2005).

A maioria dos estudos tem enfatizado os efeitos adversos do abuso de diversos EAA em mulheres adultas, no entanto, os efeitos fisiológicos do abuso destes por adolescentes do sexo feminino no início da puberdade são ainda desconhecidos, e não há preocupação de que alguns dos possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985). A análise dos efeitos do EAA em animais de laboratório antes da puberdade pode revelar dados acerca das consequências sobre o amadurecimento neuroendócrino do sistema reprodutor feminino (IRVING et al., 2002), além da sua interferência na função placentária. Outro ponto a ser destacado é que até o momento não foram estudados a interferência dos EAA nos fatores angiogênicos da placenta e ovário, porém, sabe-se que desordens vasculares podem modificar a função placentária durante as fases da gestação, e como consequência, pode prejudicar o desenvolvimento fetal (KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK, 2005).

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da administração do estanozolol em ratas pré-púberes sobre a sua fertilidade, através da análise da ciclicidade estral, abertura vaginal, hormônios sexuais, receptor estrogênico, números de sítios de implantação, histologia ovariana e placentária, bem como o processo de angiogênese em tais órgãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Esteróides anabólicos androgênicos

Os esteroides anabólico-androgênicos (EAA) referem-se aos hormônios esteroides da classe dos hormônios sexuais masculinos; dentre eles, podemos destacar a testosterona e seus derivados, com propriedades androgênicas e anabólicas. Alguns autores apontam os esteroides anabolizantes como os derivados sintéticos da testosterona que possuem atividade anabólica superior à atividade androgênica (DA SILVA; DANIEL; CZEPIELEWSKI, 2002).

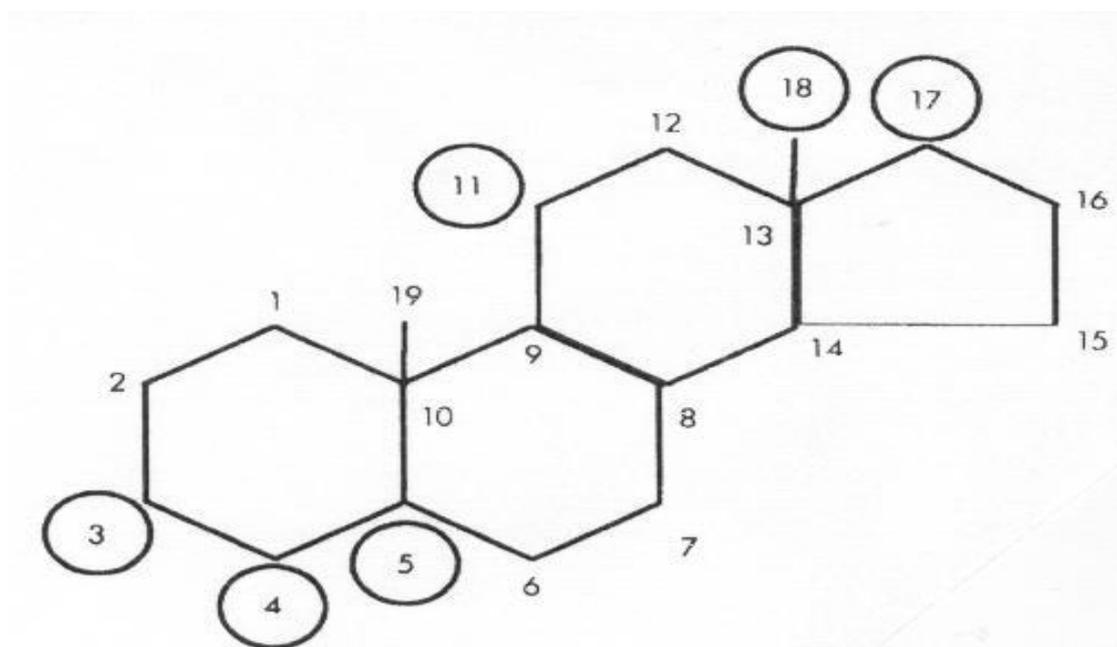
Os efeitos androgênicos são responsáveis pelo desenvolvimento do trato reprodutivo masculino e das características sexuais secundárias, assim como pela manutenção da função reprodutiva. Os efeitos anabólicos se referem ao estímulo da fixação do nitrogênio, causando um balanço nitrogenado positivo, por aumentar a síntese proteica nos músculos (SHAHIDI, 2001).

A síntese dos hormônios androgênicos dá-se a partir do colesterol. Este irá formar, após sucessivas oxidações, a pregnenolona. A pregnenolona é o principal precursor dos hormônios esteroides. Durante a conversão da pregnenolona à testosterona, ocorre a formação de di-hidrotestosterona (DHT) e de androstenediona. Estes androgênicos são posteriormente convertidos em testosterona na adrenal. O DHT, a androstenediona (4-androstenediona) e os seus compostos relacionados (5-androstenediona, 4-androstenediol, 5-androstenediol) são os precursores da testosterona mais popularmente utilizados por atletas (HANDELSMAN, 2001).

A molécula de testosterona sozinha não é eficiente quando injetada ou tomada oralmente, pois é muito susceptível a metabolização (ou inativação) relativamente rápida pelo fígado. Conseqüentemente, a estrutura química da testosterona deve ser modificada para contornar esse problema. Mais comumente, a molécula de testosterona é alquilada na posição 17 α para formar

esteroides anabólicos orais (retardando o catabolismo hepático da molécula), e esterificada na posição 17 β para formar esteroides anabólicos injetáveis, mais lipofílicos que a testosterona (Figura 1). O derivado 17 β é suspenso em óleo, o que permite a manutenção da concentração no corpo por várias semanas (YESALIS; BAHRKE, 1995; DA SILVA; DANIEL; CZEPIELEWSKI, 2002).

Figura 1: Modificações estruturais na molécula de testosterona para formação de esteroides anabólicos androgênicos.



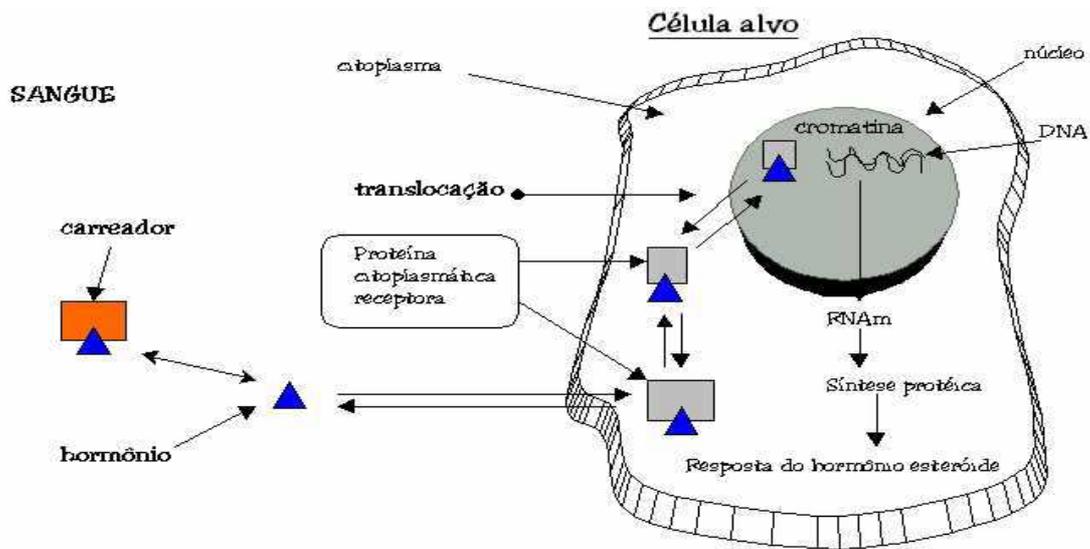
Fonte: WU, 1997.

2.2. Mecanismos de ação dos EAA

A ação dos esteroides anabólicos anabolizantes pode ser observada em grande número de tecidos-alvo, reprodutivos e não reprodutivos, incluindo osso, tecido adiposo, músculo esquelético, coração, cérebro, próstata, rins e fígado (WU, 1997). Estas substâncias podem atuar diretamente em receptores específicos, sendo que, uma vez na circulação, elas são transportadas pela corrente sanguínea como mensageiros, na forma livre ou combinada às

moléculas transportadoras, mas somente na sua forma livre difundem-se diretamente através da membrana plasmática de células-alvo ligando-se a receptores proteicos intracelulares. Dentro da célula, a molécula de esteroide ligada ao receptor androgênico específico, migra para o núcleo celular onde inicia o processo de transcrição gênica e de transdução proteica, a qual modula as ações celulares dependentes de andrógeno (SHAHIDI, 2001) (Figura 2).

Figura 2: Mecanismo de ação dos esteroides anabólicos androgênicos.



Fonte: Garrett; Grisham, 1995.

2.3. Uso terapêutico dos EAA

Os esteroides anabolizantes foram inicialmente desenvolvidos com fins terapêuticos, como exemplo, na recuperação de cirurgias e atrofia muscular, por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra, e, também, no tratamento de anemias, uma vez que estimulam a eritropoiese (CELOTTI; CESI, 1992). Estudos demonstram que a administração de quatro doses de 50mg de Deca-durabolin diluído em 1ml de óleo de amendoim foram eficazes no aumento da eritropoiese em pacientes humanos com Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (CREUTZBERG et al., 2003).

Atualmente, os EAA também têm sido administrados no tratamento das deficiências androgênicas: hipogonadismo (BHASIN et al., 1997), puberdade e crescimento retardados (SCHROOR et al., 1995), micropênis neonatal, deficiência androgênica parcial em homens idosos, deficiência androgênica secundária a doenças crônicas, e na contracepção hormonal masculina (CONWAY et al., 2000).

A terapia androgênica pode, também, ser utilizada no tratamento do câncer de mama avançado (EBELING; KOIVISTO, 1994), em garotos com estatura exagerada (CONWAY et al., 2000) e até mesmo em situações especiais da obesidade (CORRIGAN, 1999). Há relatos de uso de esteroides anabólicos em baixas doses por via transdérmica no tratamento de doenças cardiovasculares, tendo efeitos antiaterogênicos e como agentes antianginosos (ENGLISH et al., 2000).

2.4. Uso indiscriminado dos EAA

A utilização sem fins medicinais dos esteroides anabolizantes foi inicialmente referida em levantadores de peso e outros atletas de força nos anos 50. O objetivo para o uso desses hormônios por esses indivíduos era o ganho de força e massa muscular, aliado à perda de gordura corporal (FORTUNATO; ROSENTHA; CARVALHO, 2007).

No Brasil, estudos que abordam o uso de anabolizantes são escassos (IRIART; ANDRADE, 2002). Entretanto, levantamentos feitos pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicoatrópicas (CEBRID), realizados no ano de 2005 nas 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, revela que 0,9% da população (456.000) já utilizou esteroides anabolizantes alguma vez na vida; estes resultados comparados com a última estimativa realizada em 2001, obteve um aumento de 206% (CEBRID, 2005). Estudo feito com praticantes de musculação na cidade de Porto Alegre demonstrou prevalência de 11,1% de usuários de EAA (SILVA et al., 2007), em estudo realizado na cidade de Salvador foi documentado o uso indevido de anabolizantes e os danos à saúde causados por essas substâncias, entre jovens fisiculturistas das

classes populares de Salvador, alertando para um grave problema de saúde pública em nosso país (IRIART; ANDRADE, 2002).

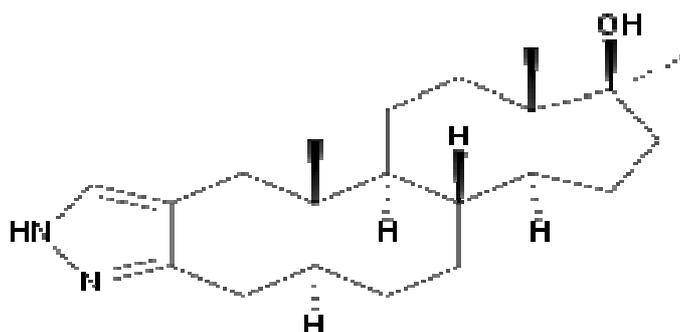
Quando usados de forma ilícita e abusiva para o aumento da massa muscular, os EAA são geralmente administrados em doses suprafisiológicas que podem chegar a 500mg/dia em ciclos que duram entre 4-6 meses. As doses e combinações usadas por atletas são de 10-100 vezes maiores que as doses terapêuticas (CLARK; HARROLD; FAST, 1997; KARBALAY-DOUST et al., 2007).

O uso dos esteroides anabolizantes, indiscriminadamente, causa uma série de alterações no metabolismo, como, alteração das variáveis bioquímicas, como hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, enzimas hepáticas, células do sistema hematopoiético e perfil lipídico sanguíneo, tais modificações podem promover efeitos colaterais adversos, como acne, atrofia testicular, retenção hídrica, alterações do humor e ginecomastia (HARTGENS, 2004).

2.5. Estanozolol

O estanozolol (EST) é um éster da testosterona [17- beta-hidróxi-17-alfa-metilandrostan-3,20-dione pirazol] (Figura 3) que possui um grande potencial anabólico e uma degradação hepática mais lenta do que o hormônio masculino natural (CLARK; BLASBERG; BENNETT-BRANDLING, 1998; PEY, 2003). Foi desenvolvido em 1959 por Clinton e colaboradores com a finalidade de ser utilizado na deficiência da síntese de proteínas e osteoporose (CLINTON et al., 1961). A estrutura deste composto sintético difere de forma acentuada da grande maioria dos esteroides anabolizantes por causa de seu núcleo pirazol anexado no seu anel. Isso faz com que a extração de estanozolol de matrizes complexas bem como sua análise seja complexa (MATEUS-AVOIS; MANGIN; SAUGY, 2004).

Figura 3: Formula química do estanozolol.



Fonte: Espírito Santo, 2006.

Dentre os EAA derivados da testosterona mais consumidos dos EUA (Tabela 1), o estanozolol aparece como um dos mais utilizados. Esse anabolizante é preferido por muitas pessoas pelo fato dele causar aumento de força sem ganho de peso em excesso, promover aumento na vascularização, e não se converter em estrógeno. Ele também não causa retenção de água em excesso, além de ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular (WILLIAMSON; CONE; HUARD, 1995).

Tabela 1: Lista dos EAA mais consumidos nos EUA ().

| Esteróides orais | Esteróides injetáveis |
|-------------------------------------|--|
| <i>Anadrol</i> (oximetolona) | <i>Deca-Durabolin</i> (decanoato de nandrolona) |
| <i>Oxandrin</i> (oxandrolona) | <i>Durabolin</i> (fenilpropionato de nandrolona) |
| <i>Dianabol</i> (metandrostenolona) | <i>Depo-testosterone</i> (cipionato de testosterona) |
| <i>Winstrol</i> (estanozolol) | <i>Equipoise</i> (undecilenato de boldenona) |

Fonte: NIDA (National Institute on Drug Abuse- Nida), 2001.

O estanozolol é utilizado no tratamento de diversas doenças e, muitas vezes, usado por atletas como uma droga anabólica, a fim de melhorar seu desempenho atlético (LUKAS, 1993). É utilizado clinicamente para o tratamento da perda de massa muscular ou enfraquecimento, em algumas anemias para estimular a eritropoese, e no tratamento de hipogonadismo, endometriose e

angioedema hereditário (COWAN et al., 1997). Veterinários podem prescrever a droga para melhorar o crescimento muscular, aumentar a densidade óssea e estimular o apetite de animais fracos ou debilitados (YUAN; LIU; HUANG, 1998; OLSON; MORCK; QUINN, 2000; POELMANS et al., 2002).

2.6. Anabolizantes e Reprodução

Experimentos em modelos animais e humanos descreveram alterações no sistema reprodutor ocasionados pelos EAA. Tais alterações no sistema reprodutor parecem ser reversíveis após interrupção do uso da droga (KARBALAY-DOUST et al., 2007). Nas mulheres, os efeitos colaterais provocados pelo consumo de EAA incluem alterações na menstruação, engrossamento da voz, encolhimento dos seios, aumento da libido, crescimento de pelos no corpo e aumento do tamanho do clitóris (MELNIK; JANSEN; GRABBE, 2007).

A literatura reporta que o uso dos esteroides anabolizantes leva a supressão da liberação das gonadotrofinas LH e FSH, alterando a ciclicidade estral (BRANN; PUTNAM; MAHESH, 1991). A constatação de que EAA suprimem a ciclicidade estral em ratos está de acordo com os relatos de irregularidade do ciclo menstrual de mulheres adultas usando EAA (GRUBER; POPE, 2000).

Estudos têm demonstrado a interferência dos EAA na fisiologia reprodutiva feminina. Segundo Chuffa et al. (2011), ratas tratadas com decanoato de nandrolona, o Deca-Durabolin, na dosagem de 5mg/kg/dia aplicado uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas demonstraram aciclicidade estral, diminuição da espessura de ambos, epitélio e estroma endometrial, além da redução no número e tamanho dos vasos sanguíneos uterinos. Far et al. (2007) utilizando a mesma dosagem demonstrou alterações na morfologia uterina, tais como atrofia do endométrio e glândulas tortuosas. Já na dosagem de 3mg/kg/dia de decanoato de nandrolona foi observado destruição dos folículos ovarianos, redução dos corpos lúteos, além de alterações no útero, como vacuolização e fibrose (GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005).

Estudo realizado por Clark, Kelton e Whitney (2003) demonstrou a ação dos EAA sobre a ciclicidade estral, verificando que a incidência da ciclicidade estral normal do grupo controle foi significativamente maior do que nos grupos que receberam uma dose de 5mg/Kg de estanozolol, além da interferência no primeiro estro vaginal. Outros estudos relatam que a abertura vaginal é um indicador precoce visível do aumento de estrógeno em ratas que receberam altas doses de EAA, demonstrando assim que a puberdade pode ser avançada pelo estrógeno e andrógenos aromatizados (OJEDA; URBANSKI, 1994).

É importante ressaltar, no entanto, que o consumo de anabolizantes por mulheres e adolescentes, mesmo por um curto período, pode ocasionar efeitos colaterais irreversíveis (HARTGENS, 2004). E que alguns dos efeitos fisiológicos de EAA sobre as mulheres são duradouros (FRANKE; BERENDONK, 1997). Além do que, os efeitos colaterais associados ao uso destes produtos por longos períodos, tanto em doses terapêuticas quanto supra-fisiológicas, ainda são desconhecidos (EVANS, 2004).

Nosso modelo experimental foi ratas pré-púberes, ou seja, ratas com 21 dias após nascimento. Optamos por usar essa fase de vida, devido ao fato que a maioria dos estudos tem enfatizado os efeitos adversos do abuso de diversos EAA em mulheres adultas, no entanto, os efeitos fisiológicos do abuso destes por adolescentes do sexo feminino no início da puberdade são ainda desconhecidos, e não há preocupação de que alguns dos possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985).

2.7. Hormônios esteroides e seus receptores

Os hormônios esteroides são moléculas lipofílicas, derivadas do colesterol e utilizadas como mensageiros químicos pelo organismo. Estes hormônios exercem sua função na célula alvo após ligação ao receptor específico, localizado predominantemente dentro do núcleo (KUHN, 2002).

Os estrogênios, hormônios esteroides, atuam no crescimento, diferenciação e funcionamento dos tecidos reprodutivos e desempenham papéis importantes em órgãos não reprodutivos, como ossos, fígado, pele, músculos, cérebro e adipócitos (KATZENELLENBOGEN et al., 2000), demonstrando assim que estes órgãos apresentam receptores para estrógenos, deste modo vários efeitos metabólicos podem resultar diretamente de eventos mediados por receptores nos órgãos afetados (VENKOV; RANKIN; VAUGHAN, 1996).

O efeito dos hormônios nos órgãos alvo é decorrente da sua ligação com os receptores intracelulares, modulando a expressão dos genes (SCHMIDT; GERDES; FEURING, 2000). A concentração de receptores nos tecidos determina sua resposta ao hormônio (DORNSTAUDER et al., 2001).

O estrogênio possui dois tipos de receptores, α e β (RE α e RE β), codificados respectivamente por genes diferentes: ESR1 e ESR2, encontrados em locais cromossômicos diferentes (CARRUBA, 2007). Em roedores, o gene do RE α encontra-se localizado no cromossomo 6, enquanto o RE β está localizado no cromossomo 14 (GRUBER et al, 2002). Além disso, ambos apresentam diferenças de expressão nos vários tecidos, assim como diferentes afinidades por ligantes (SAUNDERS et al, 1997).

Estudos indicam que o RE β possui alta expressão na próstata e ovário (MOSELMAN; PLOMAN; DIJIKEMA, 1996) e expressão moderada nos testículos e útero, tecidos estes, que também expressam RE α (KUIPER et al., 1997). A análise Imunohistoquímica da expressão dos receptores α e β estrogênicos em um ovário normal indica que ambos os receptores estão presentes, porém com distribuição diferente, com ER β predominantemente nas células granulosas de folículos e ER α localizados na região da teca e células intersticiais do ovário. O RE α é expresso nos cistos hemorrágicos, sendo

ausente nos folículos maduros e corpo lúteo, indicando a ausência de ovulação (LUBAHN et al., 1993).

2.8. Desenvolvimento placentário

A placenta é o órgão que se forma em função do sucesso da implantação do blastocisto no útero, representando o órgão funcional da unidade biológica materno-fetal, sendo constituída por uma parte fetal denominada de cório, e uma parte materna denominada de decídua basal (OLIVEIRA et al., 2006). É responsável pelo transporte dos nutrientes e dos resíduos metabólicos entre os sistemas materno e fetal (REYNOLDS; REDMER, 2001), envolvido na transmissão de nutrientes, gases e água para o feto, excreção de resíduos de produtos de metabolismo fetal no sangue materno, bem como a adaptação do metabolismo materno em diferentes fases da gestação por meio de hormônios (CETIN; ALVINO, 2009).

Com isso, a sobrevivência e o crescimento do feto são fortemente dependentes da placenta (WATSON; CROSS, 2005), onde mudanças estruturais ou funcionais podem acarretar em complicações fetais (DESOYE; MOUZON, 2003), tais como macrossomia, malformações congênitas e até mesmo morte do concepto (MAUAD, 1998).

A formação da placenta é um processo dinâmico e fundamental para a manutenção e proteção do desenvolvimento embrionário/fetal, que se inicia muito precocemente nas primeiras fases da implantação embrionária (REGNAULT et al., 2002; CROSS, 2006). De acordo com a forma de sobreposição e relacionamento do trofoblasto no epitélio uterino, no endotélio dos vasos maternos ou diretamente com o sangue materno, as placentas são classificadas como epiteliocorial, endoteliocorial ou hemocorial (CARTER et al., 2004).

O *Rattus norvegicus*, nosso modelo experimental, pertence à Ordem Rodentia e apresenta placenta hemocorial (discoidal) assim como os seres humanos. Na placenta hemocorial a interação materno-fetal resulta na invasão do leito vascular uterino pelo trofoblasto, que passar a ser banhado pelo

sangue materno extravasado (OLIVEIRA, 2006). Em ratos, Enders e Welsh (1993), observaram que se desenvolve uma placenta hemocorial labiríntica, contendo o trofoblasto em contato com o tecido conjuntivo materno não modificado, e que a resposta decidual inicia-se em função da presença do blastocisto, antes do trofoblasto alcançar a lâmina basal do epitélio uterino.

A placenta hemocorial apresenta-se constituída de três regiões morfológica e funcionalmente distinta: a decídua, o espongiotrofoblasto e a região labiríntica. A decídua alcança período de diferenciação máxima ao 10º dia, com células deciduais importantes na implantação e nutrição do embrião. Essas células produzem fatores que controlam a invasão trofoblástica e protegem o embrião da rejeição pelo sistema imune materno. O Espongiotrofoblasto caracteriza-se por zona basal com presença de células trofoblástica gigantes (CTGs). As células trofoblásticas estão envolvidas na secreção de hormônios, incluindo HCG (gonadotrofina coriônica humana) e progesterona necessária à manutenção da espessura do endométrio uterino e fatores angiogênicos de crescimento vascular e endotelial contribuindo para o remodelamento tecidual. A região Labiríntica é constituída de células labirínticas cuja função é de promover e mediar transferência de nutrientes entre o espaço sanguíneo materno e o fetal (MOREIRA et al., 2008).

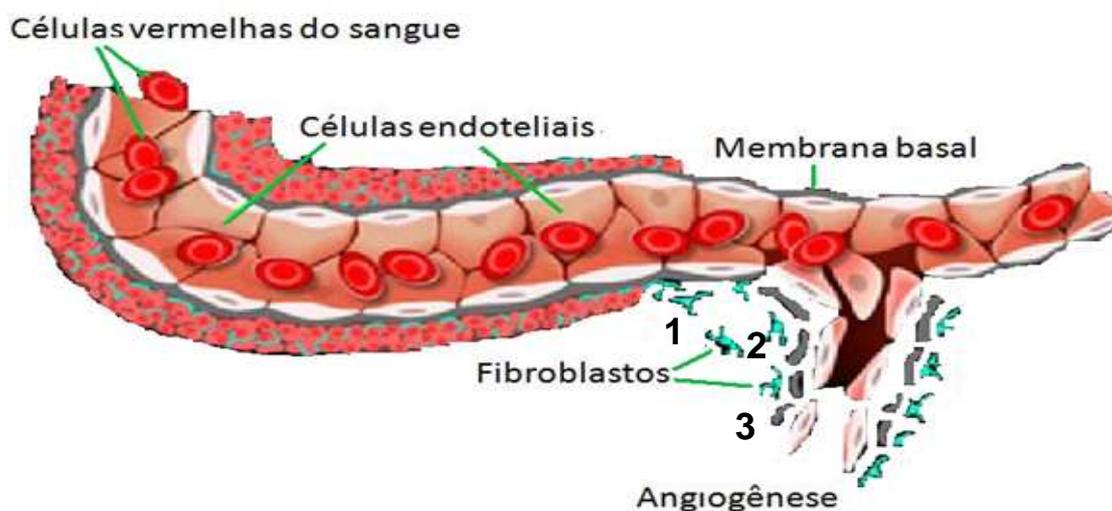
Estudos em ratas prenhes demonstraram processos de invasão trofoblástica e remodelação das artérias uterinas (placentação) semelhantes àquelas observadas em seres humanos (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; CALUWAERTS et al., 2005), assim este modelo animal torna-se interessante para pesquisar e estudar a placentação, tanto normal como patológica, além de propiciar um futuro campo para possíveis tratamento genéticos, cujos resultados possam ser extrapolados ao modelo humano (MESS, 2007; BOSCO; BUFFET, 2008).

2.9. Angiogênese

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vaso pré-existentes (PLENDL, 2000), constituindo-se um processo complexo que requer um balanço entre promotores e inibidores (SCHAMS; BERISHA, 2004). Em condições fisiológicas atua na embriogênese, no desenvolvimento tecidual, na ovulação, na formação do corpo lúteo e no processo de cicatrização (FOLKMAN, 2007).

O processo angiogênico começa com um desenvolvimento capilar e culmina na formação de uma nova microcirculação composta por arteríolas, capilares e vênulas. O início da angiogênese consiste em três processos: 1) rompimento da membrana basal da célula endotelial do vaso existente, 2) migração das células endoteliais em direção ao vaso existente como estímulo angiogênico, e 3) proliferação das células endoteliais (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é completado pela formação de um lúmen basal capilar e diferenciação de novos capilares em arteríolas e vênulas (KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK, 2005) (Figura 4).

Figura 4: Angiogênese: Processo de formação de novos vasos sanguíneos.



Fonte: Hendrix et al., 2003.

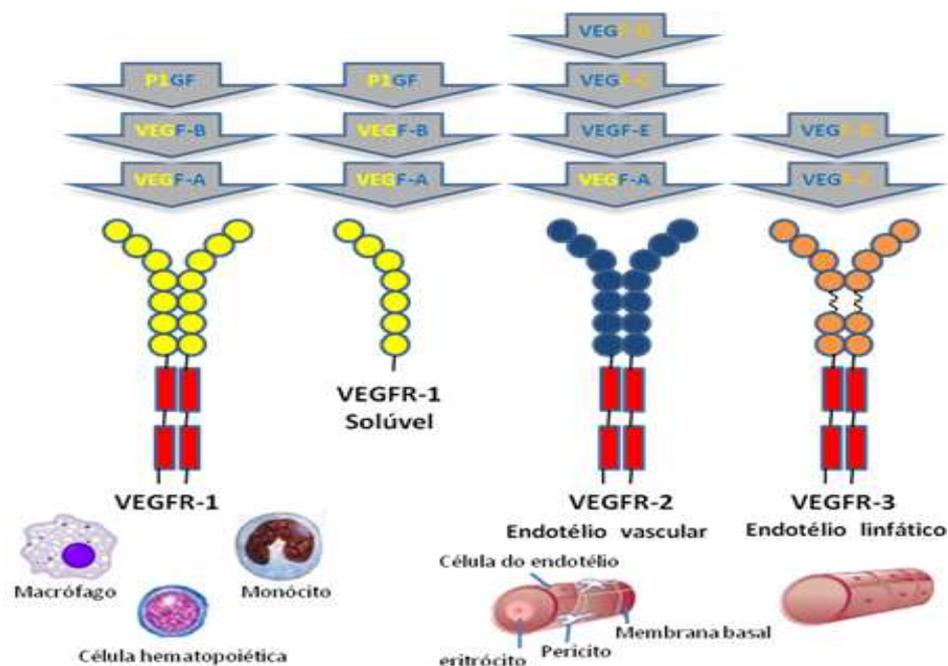
O controle do crescimento vascular e sua diferenciação é um sistema complexo de atividades e interações entre moduladores positivos e negativos (BREIER, 2000). Dentre as famílias de fatores de crescimento envolvidas com a angiogênese, destaca-se a ação do Fator de Crescimento do Endotélio, VEGF, considerado o mais efetivo na indução da proliferação endotelial vascular *in vitro* e angiogênese *in vivo* (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005).

O VEGF, molécula homodimérica, é uma molécula chave indutora da angiogênese, pois induz a proliferação, migração e formação do tubo vascular. Pertence a uma família de vários fatores de crescimento (VEGF-A, -B, -C, -D e -E) e atua inicialmente pela ligação com os receptores envolvidos no desenvolvimento dos capilares sanguíneos durante a embriogênese (HIRATSUKA et al., 2005).

Dois receptores para o VEGF, pertencentes à família de receptores tirosina-quinase foram identificados e clonados: receptor 1 para VEGF (VEGFR-1 ou Flt-1-like-tyrosine kinase receptor 1) e receptor 2 para VEGF (VEGFR-2 ou KDR-Kinase insert Domain containing Receptor) (SUGINO et al., 2000). Os receptores de VEGF fazem parte da família tirosino-quinase, possuindo diferentes atividades tirosino-quinase em resposta ao ligante (SHIBUYA, 2006).

VEGFR-1, também denominado Flt-1, é expresso em células endoteliais, monócitos/macrófagos, células dendríticas, osteoclastos e trofoblasto na placenta. Já o VEGFR-2, conhecido como KDR ou Flk-1, é altamente expresso em células endoteliais e também nas células hematopoiéticas, osteoblastos, megacariócitos, células progenitoras da retina, entre outras (ROY; BHARDWAJ; YLA-HERTTUALA, 2006), sendo considerado o principal mediador dos efeitos fisiológicos e patológicos do VEGF nas células endotelial (CROSS et al., 2002) (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática dos ligantes da família VEGF e seus receptores



Fonte: Modificado de Capp et al., 2009.

2.10. Angiogênese ovariana e placentária

A angiogênese fisiológica do sistema reprodutivo feminino, onde ocorrem ciclicamente no ovário e útero, assim como durante a gravidez, na placenta, sendo importante nos processos de desenvolvimento folicular, formação do corpo lúteo e proliferação do endométrio uterino durante o ciclo menstrual (KACZMAREK; SCHAMS; ZIECIK, 2005). E por isso, os mecanismos genéticos e moleculares que controlam a angiogênese durante o desenvolvimento folicular e placentário estão sendo elucidados (SHIMIZU; SATO, 2005).

Em todos os tecidos, inclusive ovariano, é necessário fluxo sanguíneo adequado para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, para a remoção de CO₂ e de outros subprodutos metabólicos e para a transferência de hormônios para as células-alvo (ROBINSON; WOAD; HAMMOND, 2009). Assim, no sistema genital feminino, particularmente no ovário, a angiogênese ocorre

como um processo normal e crucial para a função lútea e folicular (PLENDL, 2000).

Nos ovários, cada fase específica do ciclo hormonal é acompanhada por grandes mudanças vasculares (PLENDL, 2000), e a formação de uma rede vascular adequada é um fator limitante na seleção e na maturação do folículo dominante (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000; STOUFFER; MARTINEZCHEQUER, MOLSKNESS, 2001). Sob estímulo de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, os folículos e corpos lúteos sintetizam fatores que podem agir isoladamente ou em conjunto para regular a angiogênese (SHIMIZU; KAWAHARA; ABE, 2003).

Os fatores angiogênicos são encontrados nas células da teca, fluido folicular, células da granulosa, células luteinizadas e também foi demonstrada sua presença nas células do cumulus oophorus (PHILLIPS et al., 1990), sendo responsáveis pelas mudanças vasculares que acompanham a ovulação (PLENDL, 2000).

Em estudos realizados por Stouffer, Martinezchequer e Molskness (2001) relatam que os hormônios esteroides influenciam a síntese de VEGF. Corroborando com tais estudos, Moura (2003) afirma que a expressão do VEGF nas células da granulosa e luteínicas, bem como nas células endometriais sofrem regulação hormonal, devido ao fato que todas as células são responsivas aos hormônios esteroides. Além disso, todas essas células que expressam o VEGF produzem hormônios esteroides em resposta ao hormônio luteotrófico.

Um evento fundamental para a implantação do blastocisto e sua manutenção no ambiente uterino é o aumento da vascularização endometrial para adequação das necessidades embrionárias em relação às trocas gasosas e de nutrientes. Para tanto a vascularização passa por contínuas adaptações, como vasodilatação, aumento da permeabilidade, crescimento e desenvolvimento de novos vasos (REYNOLDS; GRAZUL-BRISKA; REDMER, 2002). O sucesso da gestação também depende da vascularização da árvore vilosa da placenta fetal que é contínua ao longo da gestação, embora muito mais acentuada nas fases iniciais (KAUFMANN; MAYHEW; CHARNOCK-JONES, 2004).

A angiogênese placentária é de fundamental importância para garantir o fluxo de sangue adequado para a placenta e, com isso, fornecer os substratos que dão suporte ao crescimento e desenvolvimento fetal. Assim, o crescimento e desenvolvimento dos leitos vasculares são considerados críticos para o crescimento e para a função útero-placentária (REYNOLDS et al., 2010). A placenta dos mamíferos sofre rápida angiogênese (REYNOLDS et al., 2006), e para que a gestação seja bem sucedida, é necessária a remodelação do endométrio, para coordenar a implantação, a angiogênese e o remodelamento vascular na interface materno-fetal, para fornecer suporte hematotrófico para o desenvolvimento do concepto (KAUFMANN; MAYHEW; CHARNOCK-JONES, 2004).

Acredita-se que uma matriz complexa de agentes pró-angiogênicos, antiangiogênicos e vasoativos sejam produzidos pelas células gigantes trofoblásticas e/ou por outras células trofoblásticas ou decíduais (BOROWICZ et al., 2007; DOUGLAS et al., 2009).

O VEGF é o principal fator angiogênico expresso pelas células gigantes trofoblásticas (VOSS; THOMAS; GRUSS, 2000). Ratas mutantes, que apresentam deleção gênica para os receptores do VEGF (flt-1 e/ou flk-1), apresentam defeitos na vasculogênese e na angiogênese feto-placentária, resultando em morte embrionária (CROSS et al., 2002). Em humanos, a expressão de VEGF e de Flk-1 é mais intensa no início da gestação e diminui com o avançar dela (JACKSON et al., 1994), já nas fases finais da prenhez em roedores, observa-se na placenta um aumento na produção de fatores angiogênicos, tais como o fator de crescimento placentário (PIGF), que contribui para o crescimento placentário, para o desenvolvimento fetal e para a manutenção da gestação (OSOL et al., 2008).

A influência dos esteroides anabólicos na angiogênese ainda é escassa, porém, segundo Carvalho e Okamoto (1985), os anabolizantes aceleram a quantidade de vasos neoformados. Até o momento não foram estudados os fatores angiogênicos na placenta e ovário de ratas submetidas ao tratamento com anabolizantes, porém, sabe-se que desordens vasculares podem modificar a função placentária durante as fases da gestação, o que como consequência, pode prejudicar o desenvolvimento fetal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIN, R.; CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Dev. Biol.**, v.260, p. 176-190, 2003.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in males rats. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**,v.93, p.43-48, 2005.

BHASIN, S.; STORER, T.W.; BERMAN, N.; YARASHESKI, K.E.; CLEVINGER, B.; PHILLIPS J. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, p.407-413, 1997.

BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BRISKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Placental growth throughout the last two-thirds of pregnancy in sheep: Vascular development and angiogenic factor expression. **Biol. Reprod.**, v.76, p.259-267, 2007.

BOSCO, C.; BUFFET, C. Immunohistochemical identification of the extravillous trophoblast during the placentation of the Degu (*Octodon degus*). **J. Exp. Zoo.**, v. 310, p.534-539, 2008

BRANN, D.W.; PUTNAM, C.D.; MAHESH, V.B. Validation of the mechanisms proposed for the stimulatory and inhibitory effects of progesterone on gonadotropin secretion in the estrogen-primed rat: a possible role for adrenal steroids. **Steroids.**, v. 56, p. 103-11, 1991.

BREIER, G. Angiogenesis in embryonic development – a review. **Placenta.**, v. 21, p. 11-15, 2000.

BYRNE, A.N.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J. Cell. Med.**, v.9, p. 777-794, 2005.

CALUWAERTS, S.; VERCRUYSSSE, L.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. **Placenta.**, v.26, p. 574-584, 2005.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; MAIA, A.L. The role of vascular endothelial growth factor in tumor. **HCPA.**, v. 29, p. 51-59, 2009.

CARVALHO A.C.P; OKAMOTO T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas da extração dental. **Rev. Odont.**, v. 14, p. 27-33, 1985.

CARRUBA, G. Estrogen and Prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen dominated scenario. **J. Cel. Bioch.**,v. 102, p.899-911, 2007.

CARTER, A.M.; ENDERS, A.C.; KUNZLE, H.; ODUOR-OKELO, D.; VOGEL, P. Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82, p. 35-48, 2004.

CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas psicotrópicas). http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/lev_domiciliar2005/index.htm.

CELOTTI, F.; CESI, P.N. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscle of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **J. Steroid. Biochem.Molec. Biol.**, v.43, p. 469-477, 1992.

CETIN, I.; ALVINO, G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport: a review. **Placenta.**, v. 16, p.77-82, 2009.

CHUFFA, L.G.A.; SOUZA, R.B.; FREI, F.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morfometrical assessment in adult rat uterus. **Anat. Rec.**, v. 294, p.335-341, 2011.

CLARK, A.S.; HARROLD, E.V.; FAST, A.S. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Horm. Behav.**,v.31, p. 35-46, 1997.

CLARK, A.S.; BLASBERG, M.E.; BENNETT-BRANDLING, E.M. Stanozolol, Oxymetholone, and Testosterone Cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiol. Behav.**,v.63, p.287-295, 1998.

CLARK, A.S.; KELTON, M.C.; WHITNEY, A.C. Chronic administration of anabolic steroids disrupts pubertal onset and estrous cyclicity in rats. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 65-71, 2003.

CLINTON, R. O.; MANSON, A.J.; STONNER, F.W.; NEUMANN, H.C.; CHRISTIANSEN, R.G.; CLARCK, R.L. Steroidal (3,2-c)pyrazoles. II. Androstanes,19-norandrostanes and their unsaturated analogs. **J. Am. Chem. Soc.**, v.83, p.1478-1491, 1961.

COCOLO, A. C. Usuário desconhece efeitos colaterais de anabolizantes. *Jornal da Paulista – Pesquisa*, ano 15, n. 168, 2002. Disponível em <<http://www.hsp.epm.br>>. (Acesso em 09/08/2012).

CONWAY, A.J.; HANDELSMAN, D.J.; LORDING, D.W.; STUCKEY, B, ZAJAC, J.D. Use, misuse and abuse of androgens. The Endocrine Society of Australia consensus guidelines for androgen prescribing. **Med. J. Aust.**, v. 172, p. 220-224, 2000.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.;CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Card. Res.**, v. 49, p.507-521, 2001.

CORRIGAN B. Dehydroepiandrosterone and sport. **Med. J. Aust.**, v.171, p. 206- 208, 1999.

COWAN, L.A.; MCLAUGHLIN, R.; TOLL, P.W.; BROWN, S.A.; MOORE, T.I.; BUTINE, M.D.; MILLIKEN, G. Effect of stanozolol on body composition, nitrogen balance, and food consumption in castrated dogs with chronic renal failure. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 211, p. 719-722, 1997.

CREUTZBERG, E.C.; WOUTERS, E.F.; MOSTERT, R.; PLUYMERS, R.J.; SCHOLS, A.M. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with

COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Chest.**, v.124, p.1733-1742, 2003.

CROSS, J.C.; HEMBERGER, M.; LU, Y.; NOKAZI, T.; WHITELEY, K.; MASUTANI, M.; ADAMSON, S.L. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.187, p.207-212, 2002.

CROSS, J.C. Placental function in development and disease. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18, p. 71-76, 2006.

DA SILVA, P.R.P.; DANIEL, S.K.I.; CZEPIELEWSKI, M.A.; Esteróides anabolizantes no esporte. **Rev. Bras. Med. Esporte.**, v.8, p. 235- 243, 2002.

DESOYE, G.; MOUZON, S.H. The placenta in diabetic pregnancy. **Diab. Cares.**, v. 30, p. 120-126, 2003.

DORNSTAUDER, E.; JISA, E.; UNTERRIEDER, I.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavono) intended for large scale use in hormone replacement therapy. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 78, p. 67-75, 2001.

DOUGLAS, N.C.; TANG, H.; GOMEZ, R.; PYTOWSKI, B.; HICKLIN, D.J.; SAUER, C.M.; KITAJEWSKI, J.; SAUER, M.M.; ZIMMERMANN, R.C.. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. **Endocrinol.**, v.150, p.3845-3854, 2009.

EBELING, P.; KOIVISTO, V. A. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet.**, v.343, p. 1479-1481, 1994.

ENDERS, E.A.C.; WELSH, A. O. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **J. Exp.Zool.**, v. 266, p. 578-587, 1993.

ENGLISH, K.M.; STEEDS, R.P.; JONES, T.H.; DIVER, M.J.; CHANNER, K.S. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Circulation.**, v.102, p. 1906-1911, 2000.

ESPIRITO SANTO, F.Z. **Estanozolol: uma revisão de literatura**. Monografia – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, SC, 006.

EVANS, N.A. Current Concepts in Anabolic-androgenic steroids. **Am. J. Sports. Med.**, v.32, p. 534-542, 2004.

FALANGA, V., GREENBERG, A.S.; ZHOU, L.; OCHOA, S.M.; ROBERTS, A.B.; FALABELLA, A.; YAMAGUCHI, Y. Stimulation of Collagen Synthesis by the Anabolic Steroid Stanozolol. **J. Invest. Dermatol.**, v.111, p.1193-1197, 1998.

FAR, H.R.M.; AGREN, G.; LINDQVIST, A.S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.; THIBLIN I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.131, p.189–197, 2007.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v.9, p. 669-676, 2003.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.6, p. 273-286, 2007.

FORTUNATO, R.S.; ROSENTHA, D.; CARVALHO, D.P. Abuso de Esteróides Anabolizantes e seu Impacto sobre a Função Tireóidea. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.51, p.1417-1424. 2007.

FRANKE, W.W.; BERENDONK, B. Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government. **Clin. Chem.**, v.43, p.1262-1279, 1997.

GARRETT, C.; GRISHA, M. Saunders College Publishing: Harcourt Brace, Orlando, FL. Biochem. Educat., v. 23, p. 106, 1995.

GEREZ, J.R.; FREI, F.; CAMARGO, I.S.S. Histological assesment of ovaries and uterus of rats subjeced to nandrolone decanoate treatment. **Contraception.**, v. 72, p. 77-80, 2005.

GRUBER, A.J.; POPE, H.G. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in woman. **Psychoter. Psychosom.**, v.69, p. 19-26, 2000.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHENEEBERGER, C.; HUBER, J. C. Production and actions of estrogens. **NEJM.**, v. 346, p. 340-352, 2002.

HANDELSMAN, D.J. Androgen action and pharmacologic uses. **Endocrinology.**, v.8, p.232-242, 2001.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med.**, v. 34, p.513-554, 2004.

HARTGENS, F. Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). **Br. J. Sports Med.**, v.38, p.253-259, 2004.

HENDRIX, M.J.C.; SEFTOR, E.A.; HESS, A.R.; SEFTOR, R.E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nat. Rev. Cancer.** v.v3, p.411-42, 2003.

HIRATSUKA, S.; NAKAO, K.; NAKAMURA, K., KATSUKI, M.; MARU, Y.; SHIBUYA, M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesisi in mice. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, p. 346-354, 2005.

IRVING, L.M.; WALL, M.; NEUMARK-SZTAINER, D.; STORY, M. Steroid use among adolescents: findings from Project EAT. **J. Adolesc. Health.**, v. 30, p. 243-52, 2002.

IRIART, J. A. B.; ANDRADE, T.M. Body-building, steroid use, and risk perception among young body-builders from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil. **Cad. Saúde. Pública.**, v. 18, p. 1379-1387, 2002.

JACKSON, M.R.; CARNEY, E.W.; LYE, S.J.; RITCHIE, J.W.. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. **Placenta.**, v. 15, p.341-353, 1994.

KACZMAREK, M.M.; SCHAMS, D.; ZIECIK, A.J. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. **Reprod. Biol.**,v. 5, p. 111-136, 2005.

KANAYAMA, G.; POPE, H.G.; HUDSON, J.I. Body image drugs: a growing psychosomatic problem. **Psych. Psychos.**, v. 10, p. 61-65, 2001.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I.; POPE, H.G. JR. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? – Review. **Drug alco. depend.**,v.98, p.1-12, 2008.

KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A.; ARDEKANI, F.M.; MIRKHANI, H. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. **Asian. J. Androl.**,v.9, p. 235-239, 2007.

KATZENELLENBOGEN, B.S.; MONTANO, M.M.; EDIGER, T.R.; SUN, J.; EKENA, K.; LAZENNEC, G.; MARTINI. P.G.; MCLNERNEY, E.M.; DELAGE-MOURROUX, R.; WEIS, K.; KATZENELLENBOGE, J.A. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 55, p. 163-93, 2000.

KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Change during normal pregnancy. **Placenta.**, v. 25, p. 114-126, 2004

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Rec. Prog. Horm. Res.**, v.57, p.411-34, 2002.

KUIPER, G.J.M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β . **Endocrinol.**, v. 138 p. 863-870, 1997.

LUBAHN, D.B.; MOYER, J.S.; GOLDING, T.S.; COUSE, J.F.;KORACH, K.S.; SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 11162-11166, 1993.

LUKAS, S.E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v.14, p.61– 68; 1993.

MARQUES, M.A.; PEREIRA H.M.G.; NETO F.R.A. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Bras. Med. Esporte.**, v.9, p. 15-24, 2003.

MATEUS-AVOIS, L.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Use of trap gas chromatography-multiple mass spectrometry for the detection and confirmation of 3'hydroxystanozolol at trace levels in urine for doping control. **J. Chromato.B. Analyt. Techol. Biomed. Life. Sci.**, v. 25,p. 193-201, 2004.

MAUAD, F. Diabetes e Gravidez: Aspectos Clínicos e Perinatais. **RBGO.**, v. 20, p. 193-198, 1998.

MELNIK, B.; JANSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of anabolic androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, v.5, p.110-117, 2007.

MESS, A. Chorioallantoic and Yolk Sac Placentation in the Dassie Rat *Petromus typicus* and its significance for the evolution of hystricognath rodents. **Placenta.**, v. 28, p. 1229-1233, 2007.

MOSSELMAN, S.; PLOMAN, J.; DIJIKEMA, R. Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS.**, v. 392, p. 49-53, 1996.

MOREIRA, G.V.; OLIVEIRA, T.V.; ZAMPIERI, M.; TOLEDO, M.T. Análise do efeito da metformina na morfologia da placenta de ratas wistar, com e sem diabetes mellitus, induzidas por aloxana. **REB.**, v.1, p. 1-15, 2008.

MOURA, C.E.B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos.** 2003. 123f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

OJEDA, S.R.; URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neil JD. **Physiol. Reprod.**, v. 2, p. 363-409, 1994.

OLIVEIRA, M.F.; CARTER, A.M.; BONATELLI, M.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). **Placenta.**, v. 27, p. 87-97, 2006.

OLSON, M.E.; MORCK, D.W.; QUINN, K.B. The effect of stanozolol on 15nitrogen retention in the dog. **Can. J. Vet. Res.**,v.64, p. 246-248, 2000.

OSOL, G.; CELIA, G.; GOKINA, N.; BARRON, C.; CHIEN, E.; MANDALA, M.; LUSKHA, L.; KUBLICHIENE. K. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.294, p. 1381-1387, 2008.

PARKINSON, A.B.; EVANS, N.A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.38, p.644-51, 2006.

PEY, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzymes activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v.87, p.269-277, 2003.

PHILLIPS, H.S.; HAINS, J.; LEUNG, D.W.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth is expressed in rat corpus luteum. **Endocrinol.**, v.2, p. 965-967, 1990.

PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. **Anat. Histol. Embryol.**, v.29, p.257-266, 2000.

POELMANS, S.; De WASCH, K.; De BRABANDER, H.F.; VAN De WIELE, M.; COURTHEYN, D.; VAN GINKEL, L. A.; STERK, S.S.; DELAHAUT, P.; DUBOIS, M.; SCHILT, R.; NIELEN, M.; VERCAMMEN, J.; IMPENS, S.; STEPHANY, R.; HAMOIR, T.; POTTIE, G.; VAN POUCKE, C.; VAN PETEGHEM, C. Analytical possibilities for the detection of stanozolol and its metabolites. **Anal. Chim. Acta.**, v. 473, p. 39-47, 2002.

POPE, H.G Jr.; KATZ, D.L. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. **A. Gen. Psyc.**, v.51, p.375-382, 2004.

REGNAULT, T.R.H.; GALAN, H.L.; PARKER, T.A.; ANTHONY, R.V. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. **Placenta.**, v. 23, p. 119-129, 2002.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine.**, v. 12, p. 1-9, 2000.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the placenta. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BRISKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 83, p. 151,163, 2002.

REYNOLDS, L.P.; CATON, J.S.; REDMER, D.A.; GRAZUL-BRISKA, A.T.; VONNAHME, K.A.; BOROWICZ, P.P.; LUTHER, J.S.; WALLACE, J.M.; WU, G.; SPENCER, T. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. **J. Physiol.**, v.572, p.51-58, 2006.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A.; LUTHER, J.S.; BUCHANAN, D.S.; HAFEZ, S.A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **Int. J. Dev. Biol.**, v.54, p.355-365, 2010.

ROBINSON, R.S.; WOAD, K.J.; HAMMOND, A.J. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reprod.**, v.138, p.869-881, 2009.

- ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS.**, v. 580, p. 2879-2887, 2006.
- SAUNDERS, P.T.K.; MAGUIRE, S.M.; GAUGHAN, J.; MILLAR, M.R. Expression of oestrogen receptor β (ER β) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. **J. Endocrinol.**, v. 154, p. 13-16, 1997.
- SCHAMS, D., BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle-anoverview. **Reprod. Dom. Anim.**, v.39, p. 241–251, 2004.
- SCHROOR, E.J.; WEISSENBRUCH, M.M.; KNIBBE, P.; WAAL, H.A.D. The effect of prolonged administration of an anabolic steroid (oxandrolone) on growth in boys with constitutionally delayed growth and puberty. **Eur. J. Pediatr.**, v.154, p.953-957, 1995.
- SHAHIDI, N.T. A review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clin. Ther.**, v. 23, p.1355-1390, 2001.
- SHIBUYA M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.30; p. 469-78, 2006.
- SHIMIZU, T.; KAWAHARA, M.; ABE, Y. Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. **J. Reprod. Devel.**, v.49, p.181-192, 2003.
- SHIMIZU, T.; SATO, E. Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. **Reprod. Biol.**, v.5, p.257-268, 2005.
- SILVA, P.R.P.; JUNIOR, L.C.M.; FIGUEIREDO, V.C.; CIOFFI, A.P.; PRESTES, M.C.; CZEPIELEWSKI, M.A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 104-110, 2007.
- SCHMIDT, B.M.W.; GERDES, D.; FEURING, M. Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? **Front. Neuroendocrinol.**, v.21, p.57-94, 2000.
- STOUFFER, R.L.; MARTINEZCHEQUER, J.C.; MOLSKNESS, T.A. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Arch. Med. Res.**, v.32, p.567-575, 2001.
- STRAUSS, R.H.; LIGGETT, M.T.; LANESE, R.R. Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes. **JAMA.**, v.253, p. 2871–2873, 1985.
- SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE, U.M.; KATO, H. Expression of factor growth of vascular endothelial and your receivers in the luteum of human body during the menstrual cycle and in early pregnancy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.10, p. 3919-3924, 2000.

VENKOV, C.D.; RANKIN, A.B.; VAUGHAN, D.E. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. **Circulation.**, v. 94, p. 727-733, 1996.

VOSS, A. K.; THOMAS, T.; GRUSS, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. **Development.**, v. 127, p. 1-11, 2000.

WATSON, E.D.; CROSS, J.C.; Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology.**, v.20, p. 180-193, 2005.

WILLIAMSON, A.E.; CONE, L.A.; HUARD, G.S. Spontaneous necrosis of the skin associated with cryofibrinogenemia, cryoglobulinemia, and homocystinuria. **Ann. Vasc. Surg.**,v. 10, p. 365-369, 1995.

WU, F.C.W. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clin. Chem.**,v.43, p. 1289-92, 1997.

YESALIS, C.E.; BAHRKE, M.S. Anabolic-androgenic steroids. **Sports. Med.**, v.19, p.326-340, 1995.

YUAN, A.; LIU, C.; HUANG, X. Treatment of 34 cases of chronic aplastic anemia using prepared Rehmannia polysaccharide associated with stanozolol. **Zhongguo. Zhong. Xi Yi Jie. He Za Zhi.**, v. 18, p.351-353, 1998.

Capítulo II

Efeito da administração do estanozolol em ratas pré-púberes, sobre a fertilidade, angiogênese e hormônios sexuais

Láise de Souza Elias¹, Sandra Maria Souza da Silva¹, Danielle Dutra Pereira¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Águiar Coelho Teixeira¹

¹ *Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Brasil*

² *Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Recife, Brasil*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

Resumo

A presente pesquisa analisou o efeito do estanozolol administrado em ratas pré-púberes sobre a fertilidade através dos seguintes parâmetros: ciclicidade estral, abertura vaginal, hormônios sexuais, número de sítios de implantação, além do peso, histologia e angiogênese ovariana e placentária. Foram utilizadas 20 ratas albinas, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: ratas pré-púberes tratadas com óleo de gergelim (GI) e ratas pré-púberes tratadas com estanozolol em uma única injeção s.c. de 5mg/Kg em óleo de gergelim (1mL/kg) como veículo(GII), no vigésimo primeiro dia após nascimento. Os resultados mostraram que o estanozolol promoveu abertura vaginal

precocemente, aumento significativo na frequência das fases de proestro e estro e declínio das fases de metaestro e diestro, elevação dos níveis estrogênicos e redução dos níveis de progesterona, redução do número de sítios de implantação, aumento do peso das placentas e ovários, além de alterações morfológicas ovarianas, menor expressão do receptor- α estrogênico e maior expressão do VEGF no tecido ovariano e placentário. Assim conclui-se que a administração de 5mg/Kg de estanozolol em ratas pré-púberes em dose única, atua como um desregulador endócrino da reprodução em ratas.

Palavras-chave: Anabolizantes, angiogênese, hormônios sexuais, receptores, reprodução, roedores.

1. Introdução

Os esteroides anabólico-androgênicos (EAA) referem-se aos hormônios esteroides sintéticos derivados da testosterona com propriedades androgênicas e anabólicas (DA SILVA; DANIEL; CZEPIELEWSKI, 2002). Os EAA foram utilizados inicialmente na clínica médica para o tratamento de doenças crônicas associadas ao estado catabólico em pacientes acometidos por: AIDS; doença pulmonar obstrutiva crônica; deficiência hepática ou renal; câncer; casos de queimadura; e recuperação pós-operatória (SHAHIDI, 2001; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; KICMAN, 2008).

Estudos, no entanto, têm demonstrado que a administração de EAA tem resultado em efeitos adversos em vários sistemas fisiológicos (HOFFMAN; RATAMESS, 2006; HOSEINI et al., 2009). Mulheres que, cronicamente, recebem doses suprafisiológicas de andrógenos, podem apresentar efeitos virilizantes, tais como hipertrofia clitoriana, voz grave, alterações menstruais, acne e alterações na concentração de lipídeos plasmáticos (KICMAN, 2008).

Estanozolol (EST) é um éster da testosterona [17- beta-hidróxi-17-alfa-metilandrostando (3,2-C) pirazol] que possui um grande potencial anabólico e uma degradação hepática mais lenta do que o hormônio masculino natural (CLARK; BLASBERG; BENNETT-BRANDLING, 1998; PEY et al., 2003). Esse anabolizante é preferido por muitas pessoas pelo fato dele causar aumento de força sem ganho de peso em excesso, promover aumento na vascularização, não se converter em estrógeno, não causar retenção de água exacerbada, além de ajudar na perda de gordura preservando a massa muscular (WILLIAMSON; CONE; HUARD, 1995).

A maioria dos estudos tem focado sobre os efeitos adversos do abuso dos EAA em mulheres adultas, no entanto, os efeitos fisiológicos do abuso destes por adolescentes do sexo feminino no início da puberdade são ainda desconhecidos, e não há preocupação de que alguns dos possíveis efeitos possam ser permanentes afetando sua vida reprodutiva (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985).

Os efeitos fisiológicos dos esteroides anabolizantes sobre o eixo neuroendócrino em desenvolvimento têm sido largamente inexplorados, e não há preocupação com a natureza e duração do potencial de rupturas neuroendócrina (ELLIOT; GOLDBERG, 2000). A análise dos efeitos do EAA em animais de laboratório antes da puberdade pode revelar dados sobre as suas consequências sobre o amadurecimento neuroendócrino do sistema reprodutor feminino (IRVING et al., 2002), além da sua interferência na função placentária. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da administração do estanozolol em ratas pré-púberes sobre a sua fertilidade, através da análise da ciclicidade estral, abertura vaginal, hormônios sexuais, números de sítios de implantação, receptores hormonais, bem como a histologia e o processo de angiogênese ovariana e placentária.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos animais

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 21 dias de idade, período em que ratas são consideradas pré-púberes (GOLDMAN et al., 2000), procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As fêmeas foram mantidas em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum* e temperatura de ± 22 ° C. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética para aprovação pelo processo de número: 23082.015842/2012.

As fêmeas foram desmamadas, pesadas e divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo I– ratas pré-púberes tratadas com óleo de gergelim (controle) e Grupo II– ratas pré-púberes tratadas com estanozolol.

2.2. Administração do estanozolol

Os animais do grupo II foram tratadas com uma única injeção s.c. de 5mg/Kg de estanozolol em óleo de gergelim (1mL/kg) como veículo, no vigésimo primeiro dia após nascimento seguindo a metodologia descrita por Whitney; Clark (1999; 2001). As fêmeas do grupo I receberam apenas uma única injeção do veículo.

2.3. Acompanhamento da abertura vaginal, do ciclo estral e acasalamento

Após cada tratamento as fêmeas foram acompanhadas para observação do período de abertura vaginal, tendo como parâmetro um pequeno orifício no canal vaginal. Posteriormente foram colhidos diariamente esfregaços vaginais até as fêmeas completarem 60 dias de idade, para verificação do ciclo estral, e em seguida, foram colocadas para acasalar.

2.4. Dosagem hormonal

O sangue (1mL) foi coletado nas ratas aos 30 e 60 dias de nascidas, mediante contenção mecânica (FLUTTERT; DALM; OITZL, 2000). A coleta foi realizada através da punção da veia caudal lateral com o uso de um cateter (24G). O material foi rapidamente centrifugado, o sobrenadante acondicionado em Eppendorf e mantido em freezer a -20°C até a dosagem hormonal. Os níveis dos hormônios 17β -estradiol e progesterona foram dosados utilizando-se o método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), através de KIT's comerciais.

2.5. Análise morfológica dos sítios de implantação, ovários e placentas

Cinco fêmeas de cada grupo foram eutanasiadas no sétimo dia de prenhez para contagem e análise morfológica dos sítios de implantação, e as demais no décimo quarto dia de prenhez para a coleta dos ovários e análise das placentas, pois nesse período ocorre a maturação placentária nos roedores (DE RIJK; VANESCH; FLIK, 2002; CALUWAERTS et al., 2005). Para tanto, as fêmeas foram anestesiadas com

hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, sendo os ovários e placentas pesados em balança analítica antes deste procedimento.

Após esses procedimentos, os cornos uterinos foram colocados em uma placa de Petri e contados com auxílio de uma lupa, levando-se em consideração as áreas dilatadas. Em seguida, os sítios de implantação, ovários e as placentas foram mergulhados em formol tamponado, permanecendo no mesmo por 48 horas, clivados e processados para inclusão em parafina. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 3 μ m e submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.6. Imunohistoquímica para receptor- α de estrógeno nos ovários

Lâminas previamente silanizadas contendo cortes de ovários foram submetidas à recuperação antigênica e lavadas em diferentes soluções tampões de acordo com o protocolo experimental. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário antireceptor de estrógeno (monoclonal mouse Anti-Human estrogen Receptor α clone 1D5 Dakocytomation – CA USA.), posteriormente, foi realizada a incubação com anticorpo secundário ligado à peroxidase (Envision® Flex HRP – Dakocytomation – CA, USA. Cód SM805) e contracoradas com Hematoxilina. Para a análise microscópica da marcação imunohistoquímica dos ovários realizou-se a captura de imagens por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50.

2.7. Western blotting para Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos ovários e placenta

Para avaliação da expressão proteica, as proteínas presentes no homogenato ovariano e placentário (80µg) foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), e transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – G&E). Após o bloqueio de sítios de ligação não-específica, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o anticorpo primário desejado (anticorpos anti-VEGF– Santa-Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Os blots foram visualizados através de quimioluminescência (ECL Western Blotting Detection Reagent e Amersham Hyperfilm ECL – G&E).

2.8. Análise Estatística

A análise estatística do período de abertura vaginal, fases do ciclo estral, dosagens hormonais, número de sítios de implantação, peso dos ovários e placentas e expressão do VEGF ovariano e placentário foram realizadas por meio do método não-paramétrico o de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

3. Resultados

3.1. Abertura vaginal e ciclo estral

A abertura vaginal ocorreu significativamente mais cedo nas ratas do grupo tratado com estanozolol ($27,9 \pm 0,73$ dias) em relação às ratas grupo controle ($38,9 \pm 0,87$ dias) (Fig. 1). A análise do ciclo estral mostrou que as fêmeas do grupo tratado com estanozolol apresentaram aumento significativo na frequência das fases de proestro e estro e declínio das fases de metaestro e diestro, em relação às fêmeas do grupo controle (Fig. 2).

3.2. Dosagens hormonais

Os níveis de 17β -estradiol apresentaram-se significativamente elevados nas fêmeas pré-púberes aos 30 e 60 dias de vida tratadas com estanozolol, enquanto os níveis de progesterona mostraram redução significativa, quando comparadas as do grupo controle (Tabela 1).

3.3. Análise morfológica dos sítios de implantação, ovários e placentas

A análise estatística do número de sítios de implantação nos animais dos grupos experimentais revelou que o tratamento com a estanozolol reduziu significativamente os sítios em relação ao controle. Em contrapartida, o tratamento com estanozolol aumentou significativamente o peso dos ovários e das placentas (Tabela 2).

A análise morfológica dos sítios de implantação nas ratas dos grupos experimentais mostrou que os mesmos estavam totalmente inseridos na parede do útero, porém nas ratas tratadas com o estanozolol estes sítios mostraram-se menos desenvolvidos (Figs. 3A e 3B).

Histologicamente os sítios de implantação nas ratas do grupo controle mostraram-se constituídos por trofoblastos volumosos, alguns com atividade mitótica e citotrofoblastos poliplóides (Fig. 3C). Entretanto, no grupo tratado com estanozolol, os sítios mostraram trofoblastos pouco volumosos e raros citotrofoblastos (Fig. 3D). As placentas, com quatorze dias de desenvolvimento, das ratas dos grupos experimentais não mostraram alterações histológicas significativas, caracterizando-se pela observação da região da decídua bastante vascularizada e a região do disco placentário bem desenvolvido, com as três camadas: camada do labirinto, região mais externa e a mais espessa, caracterizada pela presença de numerosas lacunas contendo vasos maternos e fetais; a camada do trofospongio com trofoblastos indiferenciados, e a camada de células trofoblásticas gigantes, bastante desenvolvida e com núcleos volumosos (Figs. 3E e 3F).

Os ovários das ratas do grupo controle apresentavam-se revestidos por epitélio simples cúbico, repousando sobre a albugínea ovariana, com a região cortical e medular bem definidas. Na região cortical foram observados poucos folículos e grande quantidade de corpos lúteos (Fig. 4A). Nos animais de grupo II, os ovários mostraram-se também revestidos por epitélio simples cúbico, apoiado na túnica albugínea, apresentando as regiões cortical e medular bem definidas, no entanto, na região cortical, observou-se a predominância de folículos terciários, além de poucos corpos lúteos (Fig. 4B).

3.4. Imunohistoquímica dos receptores α -estrogenicos ovarianos

Os resultados mostraram que houve redução da expressão dos receptores α -estrogênicos nos ovários das ratas tratadas com estanozolol, em comparação aos ovários das ratas do grupo controle (Figs. 4C e 4D).

3.5. Western blotting para VEGF

Foi observado que tanto nos ovários como nas placentas das ratas tratadas com estanozolol, a expressão protéica do VEGF, analisado em UA/g de tecido, apresentou-se maior quando comparada ao grupo controle (Figs. 5 e 6).

4. Discussão

No presente estudo, foi demonstrada a antecipação da abertura vaginal nas ratas do grupo tratado com estanozolol, bem como alteração na ciclicidade estral, com predominância das fases de proestro e estro. Estes eventos podem ser reflexos dos elevados níveis estrogênicos verificados nas ratas com 30 e 60 dias de vida, provando que os EAAs influenciam na fisiologia do sistema reprodutor feminino (GOLDMAN et al., 2000), promovendo quebra na ciclicidade (CLARK; KELTON; WHITNEY, 2003).

Nas ratas, o início da puberdade pode ser definido como o período de transição entre a abertura vaginal e a primeira ovulação (GOLDMAN et al., 2000). Essa abertura só se torna patente a partir da estimulação estrogênica (OJEDA; URBANSKI, 1994), ocorrendo, na maioria dos casos, entre 30 e 37 dias de vida (GOLDMAN et al., 2000). Assim, o estanozolol mesmo em uma única dose pode ter atuado como um desregulador

endócrino, interferido na esteroidogênese normal produzindo nas ratas um evento fisiológico similar ao que antecede o estado de estro permanente produzidos por andrógenos (GEREZ; FREI; CAMARGO, 2005; MOBINI FAR et al., 2007.)

A análise morfológica dos ovários revelou aumento dos folículos, além da redução de corpos lúteos, quando comparados ao grupo controle, demonstrando que o estanozolol interfere na morfologia ovariana. Tais resultados corroboram estudos realizados por Gerez, Frei e Camargo (2005), onde observaram ausência de corpos lúteos associado à atresia folicular em ratas tratadas com doses de 3mg/Kg de decanoato de nandrolona. Sabe-se também que os andrógenos atuam no estímulo à atresia e na luteólise, resultando na redução ou ausência de corpos lúteos (CAMARGO et al., 2009), por sua vez, a redução de corpos lúteos observada pode ser correlacionada com os baixos níveis de progesterona encontrados no grupo tratado com estanozolol, pois Lüttgenauet al. (2011) relata que baixas concentrações de progesterona influencia no desenvolvimento do corpo lúteo, bem como no desenvolvimento folicular.

É bem conhecido que os níveis de ligantes podem regular a expressão de seus receptores específicos e que o aumento ou a diminuição da expressão dependerá do tecido e das condições fisiológicas. Em geral, o aumento da concentração de ligantes acarreta a diminuição da expressão dos receptores e vice-versa (MITCHNER; GARLICK; BEN-JONATHAN, 1998). Os estrógenos podem promover a regulação da expressão de RE α (COTRONEO et al., 2001), justificando assim os resultados obtidos em nosso experimento, onde foi observado um aumento nos níveis de 17 β -estradiol, porém, uma menor expressão dos RE α nos ovários. Corroborando nossos achados, Shupnik, Gordon e Chin (1989) mostraram que, após a ovariectomia, os níveis de RNAm do RE α aumentaram no útero.

Essa menor expressão dos RE α associada à diminuição dos níveis de progesterona pode ter contribuído para a menor quantidade de corpos lúteos encontrados no grupo tratado com estanozolol, devido ao fato que os receptores androgênicos e estrogênicos atuam no processo de formação do corpo lúteo (HU et al., 2004), bem como no crescimento folicular (WANG et al., 2001), assim a redução ou alteração do gene RE α pode interromper todas as funções ovarianas dependentes de estrógeno, como foliculogênese e luteinização (FARIA et al., 2010). Britt et al. (2000) verificou que animais knockout para RE α não sofreram luteinização, demonstrando que RE α medeia às ações do estrógeno em uma variedade de tecidos reprodutivos, como o ovário (WALTERS, 1985). Com base nestes estudos, pode-se supor que as alterações observadas na foliculogênese do grupo tratado poderia ser uma consequência da menor expressão do RE α nos folículos.

Sabe-se que os EAAs suprimem a produção do GnRH no hipotálamo, que por conseguinte, impede a liberação de LH, sendo este um fator essencial para a ruptura dos folículos e formação de corpos lúteos (PETRIK et al., 2002). Assim, a redução dos sítios de implantação nos animais tratados com estanozolol pode estar relacionada à menor quantidade de corpos lúteos observados nos ovários das ratas tratadas, associado ao aumento dos níveis estrogênicos e redução dos níveis de progesterona , levando assim a uma condição anovulatória. Pois, concentrações suficientes de progesterona e seus receptores são considerados pontos críticos para a implantação do embrião, indicando fertilidade e, conseqüentemente decidualização (KURIHARA et al., 2007).

A angiogênese, particularmente no ovário e na placenta é essencial para a função desses órgãos (CROSS, 2005). Assim, alterações na angiogênese desses órgãos podem comprometer a fertilidade (CHOKSI et al., 2003).

O aumento da expressão do VEGF nos ovários e nas placentas sugere uma maior vascularização, o que poderia justificar o aumento significativo do peso dos ovários e placentas das ratas do grupo tratado. Essa maior expressão do VEGF pode estar associada ao aumento dos níveis estrogênicos observados na corrente sanguínea do grupo tratado com estanozolol.

Com relação ao controle da expressão gênica dos fatores angiogênicos acredita-se que o estrógeno seja um fator chave nesse controle, uma vez que o 17β -estradiol estimula o aumento da regulação do mRNA do VEGF (REYNOLDS et al., 2010). A administração de estrógeno demonstrou um aumento da expressão do VEGF e FGF-2 e aumentou de 5-10 vezes a angiogênese e o fluxo sanguíneo uterino (REYNOLDS; REDMER, 2001). Estudos relatam que o 17β -estradiol pode estimular diretamente a expressão de VEGF no ovário de ratas (DANFORTH et al., 2003) e em células do endométrio humano *in vitro* (SHIFREN et al., 1996).

A expressão do VEGF no citotrofoblasto da placenta humana e a vascularização da zona de labirinto da placenta são aumentadas quando os níveis de estrógeno são elevados. Em contrapartida, quando esses níveis são diminuídos há uma inibição da aromatase, enzima que contribui para o aumento da produção de estrógeno, sugerindo que o estrógeno tenha um importante papel no aumento da expressão de VEGF e conseqüentemente na vascularização da zona do labirinto (DAIR et al., 2008). Mesmo sabendo da importante influência do estrógeno no processo angiogênico, ainda não está claro até que ponto o estrógeno regula diretamente o crescimento e a estrutura dos vasos sanguíneos reprodutivos (ROGERS; ABBERTON, 2003).

Sabendo que a angiogênese é um complexo processo que envolve os principais fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), a família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), o sistema

angiopoietina (ANGPT) e a família dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ROBINSON et al., 2009), assim são necessários posteriores estudos para verificar a influência do estrógeno sobre os demais fatores, para assim afirmar que o aumento do estrógeno provocado pela administração de EAAs atuem no processo de formação de novos vasos sanguíneos.

5. Conclusão

A administração de 5mg/Kg de estanozolol em ratas pré-púberes em dose única, atua como um desregulador endócrino da reprodução em ratas, provocando alterações na ciclicidade estral, abertura vaginal, morfologia ovariana, níveis hormonais de estrógeno e progesterona, menor expressão de receptor estrogênico, bem como alterações na angiogênese ovariana e placentária.

6. Referências

BRITT, K.L.; DRUMMOND, A.E.; COX, V.A.; DYSON, M.; WREFORD, N.G.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R.; FINDLAY, J.K. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. **Endocrinology**, v.141, p.2614–2623, 2000.

CALUWAERTS, S.; VERCRUYSSSE, L.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. **Placenta**, v. 26, p. 574-584, 2005.

CAMARGO, I.C.C.; BARREIROS, S.R.; MESQUITA, S.F.P.; CHUFFA, L.G.; FREI, F. Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolonedecanoate and submitted to physical effort. **Acta. Biol. Hung.**, v. 60, p.253-261, 2009.

CHOKSI, N.Y.; JAHNKE, G.D.; HILAIRE, C.S.;SHELBY M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health.**Birth. Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, v.68, p.479-491, 2003.

CLARK, A.S.; BLASBERG, M.E.; BENNETT-BRANDLING, E.M. Stanozolol, Oxymetholone, and Testosterone Cypionate effects on the rat estrous cycle. **Physiol. Behav.**, v.63, p.287-295, 1998.

CLARK, A.S.; KELTON, M.C.; WHITNEY, A.C. Chronic administration of anabolic steroids disrupts pubertal onset and estrous cyclicity in rats. **Biol. Reprod.**, v. 68, p.65-71, 2003.

COTRONEO, M.S.; WANG, J.; ELTOUM, I.A.; LAMARTINIERE, C.A. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. **Molecular and Cellular Endocrinology.**, v. 173, p. 135-145, 2001.

CROSS, J. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - a review. **Placenta.**, v.26, p.3-9, 2005.

DAIR, M.; CUI, P.; YU, M.; HAN, J.; LI, H.; XIU, R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by coc12 in cultured cancer cells. **J. Pineal Res.**, v.44, p.121-6, 2008.

DANFORTH, D.R.; ARBOGAST, L.K.; GHOSH, S.; DICKERMAN, A.; ROFAGHA, R.; FRIEDMAN, C.I. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. **Biol. Reprod.**, v.68, p.1736-1741, 2003.

DE RIJK, E.P.C.T.; VAN ESCH, E.; FLIK, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. **Toxicologic. Pathol.**, v. 30, p. 271-282, 2002.

ELLIOT, D.L.; GOLDBERG, L. Women and Anabolic Steroids. In: Yesalis CE, editor. **Anabolic Steroids in Sport and Exercise**. Champaign: J. **Hum. Kinet.**, p. 225–246, 2000.

FARIA, T.S.; BRASIL, F.B.; SAMPAIO, J.B.F.; RAMOS, C.T. Effects of maternal undernutrition during lactation on estrogen and androgen receptor expressions in rat ovary at puberty. **Nutrition.**, v.26, p.993-999, 2010.

FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M.S. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. **Lab. Anim.**, v. 34, p. 372 - 378, 2000.

GEREZ, J.R.; FREI, F.; CAMARGO, I.C.C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolonedecanoate treatment. **Contracep.**, v. 72, p. 77-80, 2005.

GOLDMAN, J.M.; LAWS, S.C.; BALCHAK, S.K.; COOPER, R.L.; KAVLOK, R.J. Endocrine-Disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 135-196, 2000.

HOFFMAN, J.R.; RATAMESS, N.A. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? **J. Sports. Sci. Med.**, v. 5, p. 182-193, 2006.

HOSEINI, L.; ROOZBEH, J.; SAGHEB, M.; KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A. Nandrolonedecanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. **Micron.**, v. 40, p.226-30, 2009.

HU, Y.C.; WANG, P.H.; YEH, S.; WANG, R.S.; XIE, C.; XU, Q.; ZHOU, X.; CHAO, H.T.; TSAI, M.Y.; CHANG, C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.101, p.11209-11214, 2004.

IRVING, L.M.; WALL, M.; NEUMARK-SZTAINER, D.; STORY, M. Steroid use among adolescents: findings from Project EAT. **J. Adolesc. Health.**, v. 30, p. 243-52, 2002.

KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br. J. Pharmacol.**, v. 154, p. 502-521, 2008.

KURIHARA, I.; LEE, D.K.; PETIT, F.G.; JEONG, J.; LEE, K.; LYDON, J.P.; DEMAYO, F.J.; TSAI, M.J.; TSAI, S.Y. COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity. **PLoS Genet.**, v. 3, p. 102, 2007.

LÜTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S.E.; KASTELIC, J.P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology.**, v. 76, p. 12-22, 2011.

MITCHNER, N. A.; GARLICK, C.; BEN-JONATHAN, N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors α and β in the rat pituitary gland. **Endocrinology.**, v. 139, p. 3976-3983, 1998.

MOBINI FAR, H.R.; AGREN, G.; LINDQVIST, A.S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.; THIBLIN, I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolonedecanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 131, p. 189-197, 2007.

OJEDA, S.R.; URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. **Physiol. Reproduction.**, v. 2. p. 363-409, 1994.

PETRIK, J.J.; GENTRY, P.A.; FEIGE, J.J.; LAMARRE, J. Expression and localization of thrombospondin-1 and -2 and their cell surface receptor, CD36, during rat follicular development and formation of the corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.67, p.1522-1531, 2002.

PEY, A.; SABORIDO, A.; DELGADO, J.; MEGÍAS, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzymes activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v.87, p.269-277, 2003.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the placenta. **Biol. Reprod.**, v.64, p.1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME K.A.; LUTHER, J.S.; BUCHANAN, D.S.; HAFEZ, S.A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **Int. J. Dev. Biol.**, v.54, p.355-365, 2010.

ROBINSON, R.S.; WOAD, K.J.; HAMMOND, A.J.; LAIRD, M.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction.**, v.138, p. 869-881, 2009.

ROGERS, P.A.; ABBERTON, K.M. Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. **Microsc. Res. Tech.**, v.60, p.412-419, 2003.

SHIFREN, J.L.; TSENG, J.F.; ZALOUDEK, C.J.; RYAN, I.P.; MENG, Y.G.; FERRARA, N.; JAFFE, R.B.; TAYLOR, R.N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.81, p.3112-3118, 1996.

SHUPNIK, M.A.; GORDON, M.S.; CHIN, W.W. Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. **Mol. Endocrinol.**, v. 3, p. 660-665, 1989.

STRAUSS, R.H.; LIGGETT, M.T.; LANESE, R.R. Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes. **JAMA.**, v. 253, p. 2871-2873, 1985.

WALTERS, M.R. Steroid hormone receptors and the nucleus. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 512-43, 1985.

WANG, H.; ANDOH, K.; HAGIWARA, H.; XIAOWEI, L.; KIKUCHI, N.; ABE, Y.; YAMADA, K.; FATIMA, R.; MIZUNUMA, H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. **Endocrinology.**, v.142, p. 4930-4936, 2001.

WHITNEY, A. C.; CLARK, A. S. Stanozolol disrupts the onset of puberty in the female rat. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 25, p. 612, 1999.

WHITNEY, A. C.; CLARK, A. S. Effects of acute stanozolol treatment on puberty in female rats. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1460-1465, 2001.

WILLIAMSON, A. E.; CONE, L. A.; HUARD, G. S. Spontaneous necrosis of the skin associated with cryofibrinogenemia, cryoglobulinemia, and homocystinuria. **Ann. Vasc. Surg.**, v.10, p.365-369, 1995.

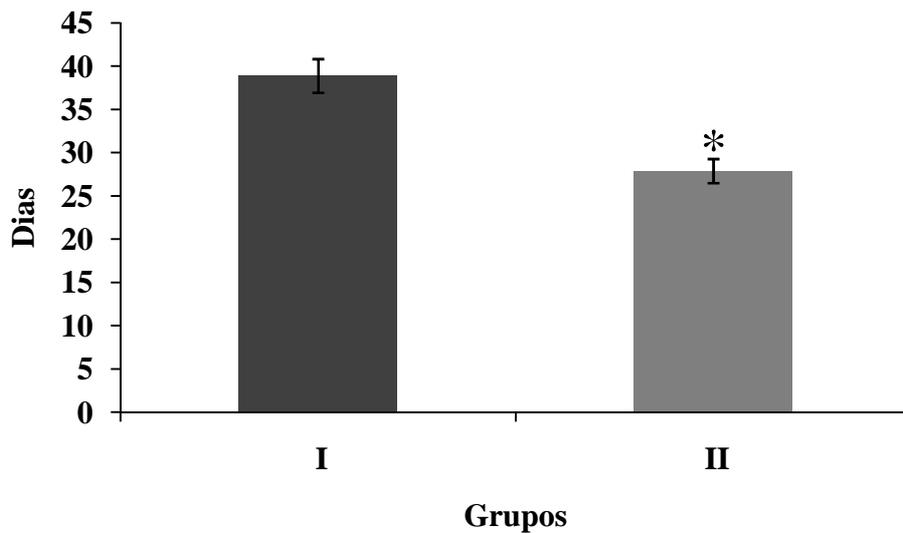


Figura 1: Média, em dias, do período de abertura vaginal nas fêmeas dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

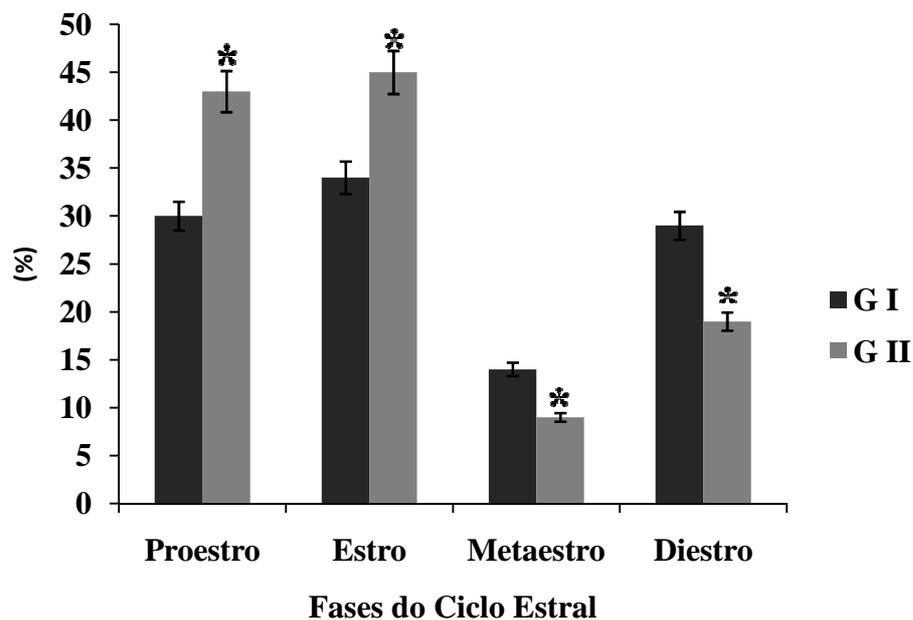


Figura 2: Média do percentual das fases do ciclo estral das fêmeas dos grupos experimentais. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos níveis séricos (ng/mL) de estradiol e progesterona nas fêmeas com 30 e 60 dias de nascidas.

| Grupos | I | II | P |
|---------------------|----------------|-----------------|----------|
| 30 Dias | | | |
| Estradiol | 514,66 ± 7,44a | 641,34 ± 5,76b | 0,0209 |
| 60 Dias | | | |
| Estradiol | 678,00 ± 8,56a | 724,35 ± 6,71b | 0,0271 |
| 30 Dias | | | |
| Progesterona | 537,68 ± 9,77a | 449,09 ± 8,17b | 0,0079 |
| 60 Dias | | | |
| Progesterona | 577,31 ± 8,21a | 515,84 ± 12,71b | 0,0121 |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 2: Médias e desvio padrão do número de sítios de implantação e peso das placentas e ovários nos grupos experimentais.

| Grupos | I | II | P |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------|
| Número de sítios | 12,60 ± 2,07a | 9,40 ± 1,51b | 0,0095 |
| Peso dos Ovários (mg) | 1,53 ± 0,08a | 1,89 ± 0,13b | 0,0159 |
| Peso das Placentas (mg) | 0,224 ± 0,059a | 0,316 ± 0,018b | 0,0119 |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

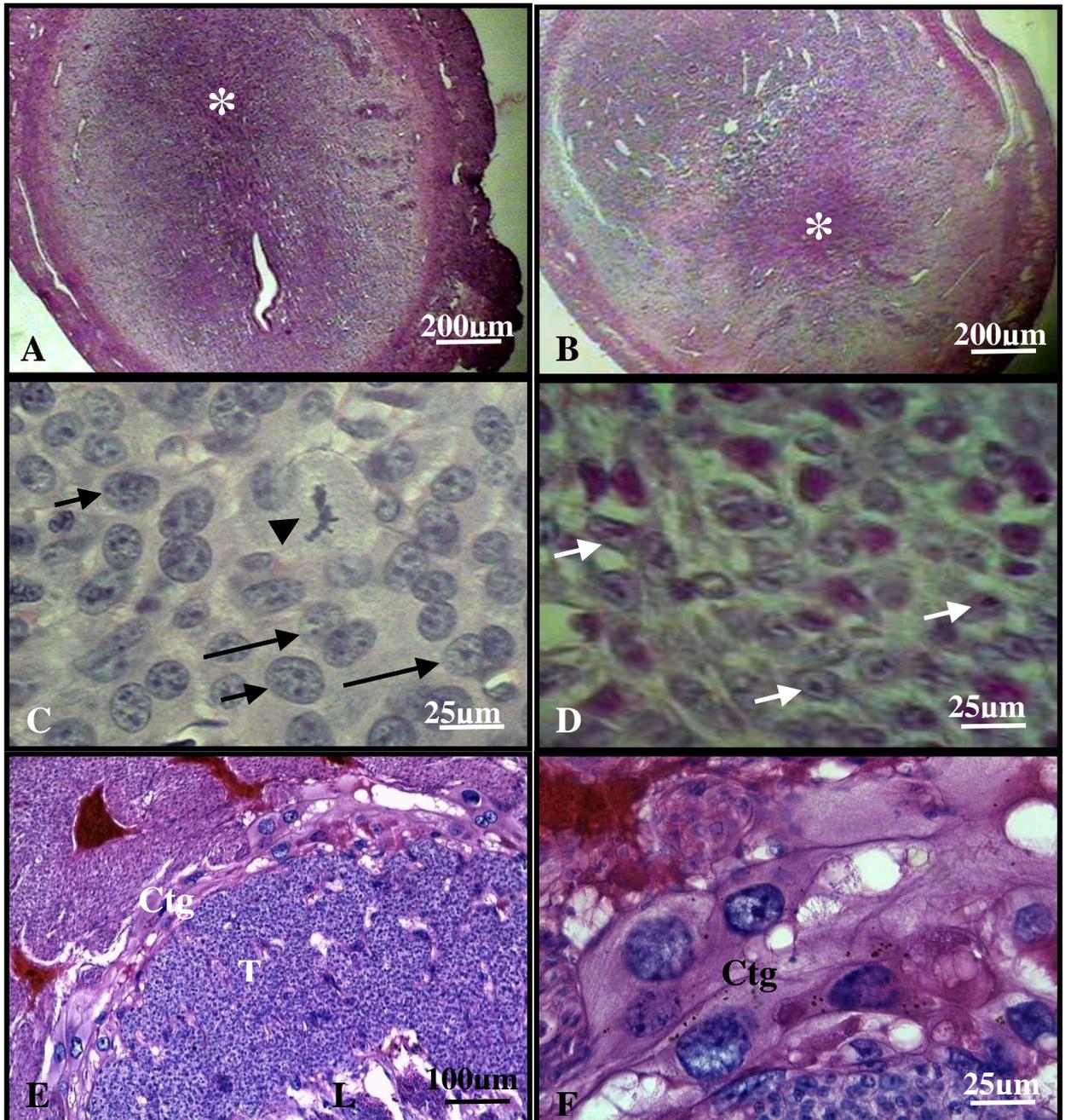


Figura 3: Sítio de implantação (*) de ratas do grupo controle (A) e tratado com estanozolol (B). (C) – Grupo controle: trofoblastos volumosos (setas pretas) e em mitose (ponta de seta), além de citotrofoblasto poliplóide (setas longas). (D) - Grupo estanozolol: observar trofoblastos pouco volumosos (setas brancas). (E) -Disco placentário de rata do grupo controle: labirinto (L)trofospongio (T) e Célula trofoblástica gigante (Ctg). (F) – Grupo estanozolol: Camada de células trofoblásticas gigantes (CTg). Coloração H.E.

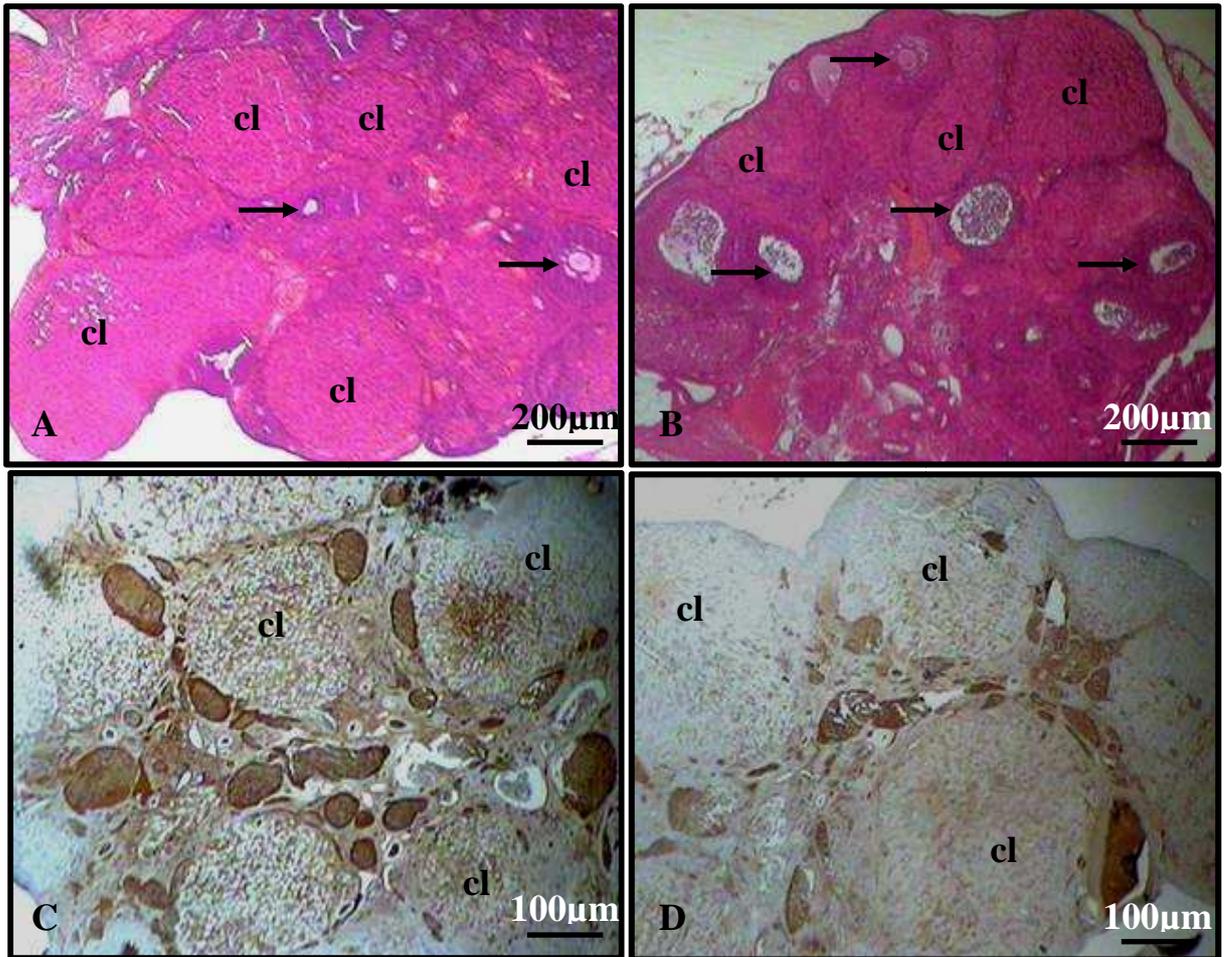


Figura 4: Ovários de ratas: (A) Grupo controle: Grande quantidade de corpos lúteos (cl) e poucos folículos ovarianos (setas). (B) Grupo tratado com estanozolol: pouca quantidade de corpos lúteos (cl) e vários folículos ovarianos (setas). Coloração H.E. Imunohistoquímica de receptores de estrógeno nos ovários: (C) Grupo controle: Observar forte marcação nos corpos lúteos (cl). (D) – Grupo tratado com estanozolol: Fraca marcação nos corpos lúteos.

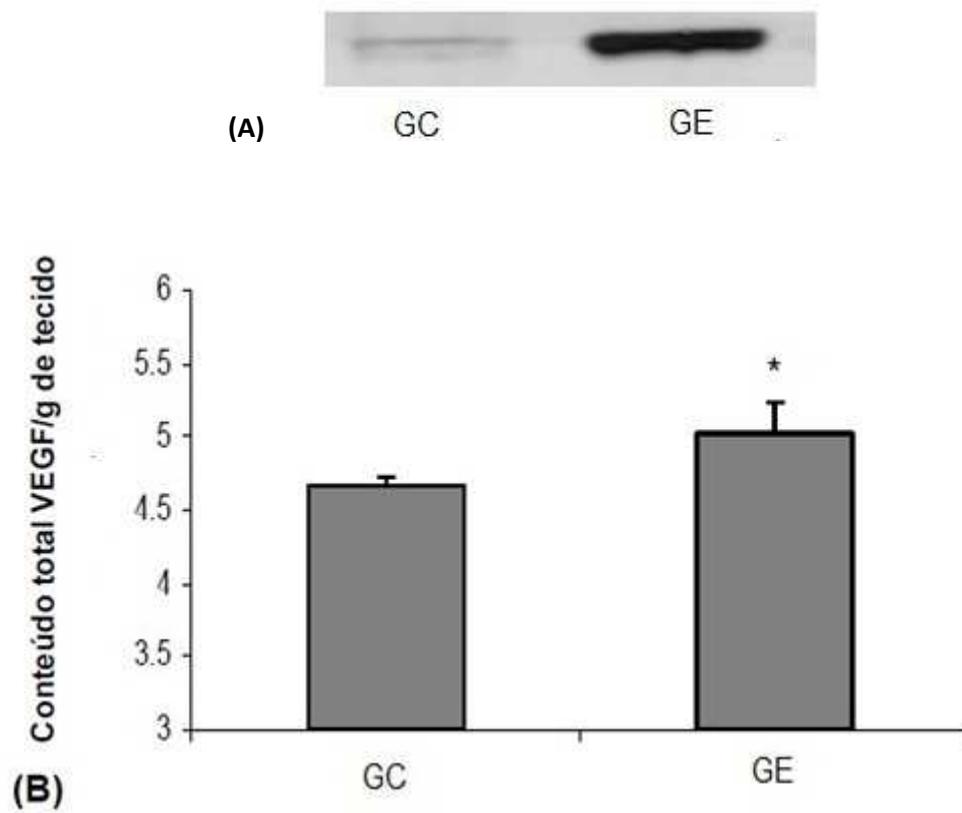


Figura 5: Análise das proteínas VEGF no ovário de ratas controle e tratadas com estanozolol. (A) Blots ilustrativos e (B) Gráfico representando o conteúdo total de VEGF em UA/g de tecido. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

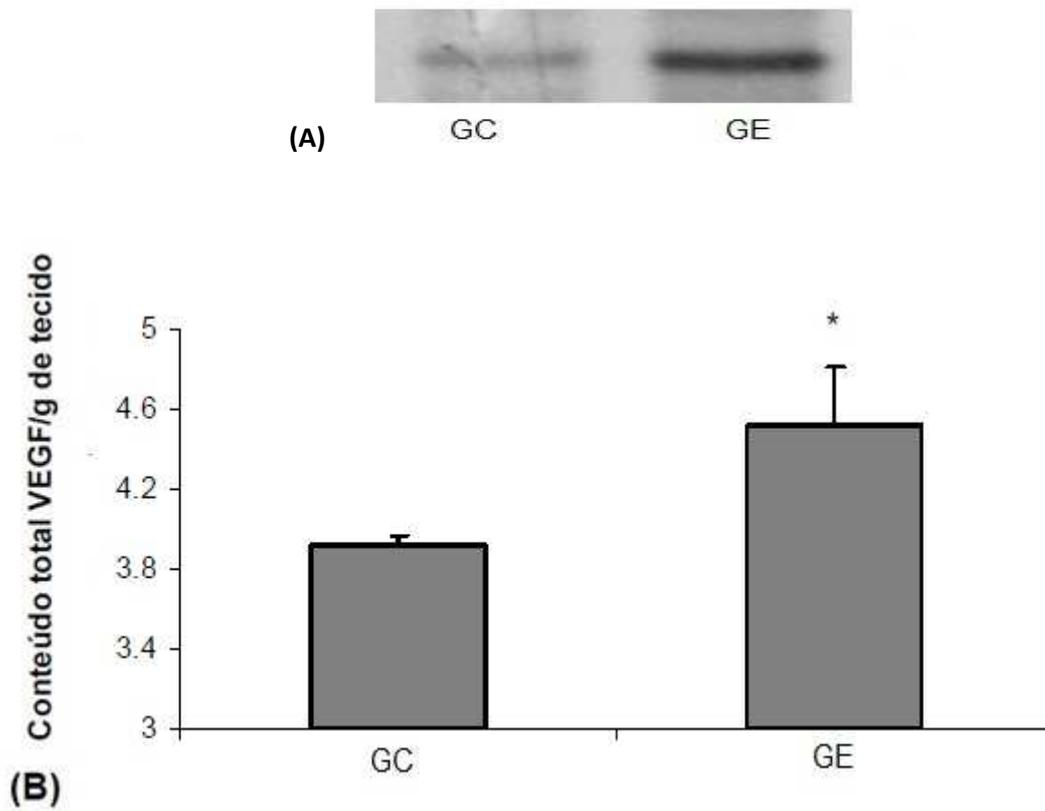


Figura 6: Análise das proteínas VEGF na placenta de ratas controle e tratadas com estanozolol. (A) Blots ilustrativos; (B) Gráfico representando o conteúdo total de VEGF em UA/g de tecido. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos