



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

Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste
de mutação e recombinação somática (SMART) em
Drosophila melanogaster

Aluno: **Bruno Lassmar Bueno Valadares**

Orientador: **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**

Uberlândia – MG
2007



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

Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste
de mutação e recombinação somática (SMART) em
Drosophila melanogaster

Aluno: **Bruno Lassmar Bueno Valadares**

Orientador: **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Uberlândia, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área: Genética).

Uberlândia – MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- V136a Valadares, Bruno Lassmar Bueno, 1977-
Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* / Bruno Lassmar Bueno Valadares. - 2007.
113 f. : il.
- Orientador: Mário Antônio Spanó.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 575.224.4

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

Palavras chave: Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART); esteróides androgênicos anabólicos; derivados sintéticos de testosterona; Deca Durabolin; Durateston; Hemogenin; Winstrol Depot; citocromo P450; Uretano.



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

Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste
de mutação e recombinação somática (SMART) em
Drosophila melanogaster

Aluno: **Bruno Lassmar Bueno Valadares**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (Orientador)

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg Antunes

Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Prof. Dr. Edson José Fragiorge

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes

Data da Defesa: 23 de outubro de 2007

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

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
Orientador

Aos meus pais, **Geraldo Antônio Valadares e Emilia Maria Lassmar Bueno Valadares**, dedico este trabalho e meu empenho em concluir mais esta etapa.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Mário Antônio Spanó**, pelos ensinamentos, conselhos, paciência, compreensão, dedicação e atenção nesses mais de dez anos de orientação (desde março de 1997, quando vim pedir meu primeiro estágio na graduação, a outubro 2007, quando encerro meu curso de doutorado); pelo exemplo de pessoa e profissional que pretendo seguir, e com quem espero manter os laços na carreira científica.

Ao Prof. Dr. **Ulrich Graf**, do Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zürich, Switzerland, pelo fornecimento das linhagens de *Drosophila melanogaster* e material necessário para a realização do Teste de Mutação e Recombinação Somática.

Aos membros da Comissão Examinadora, Prof^a. Dr^a. **Lusânia Maria Greggi Antunes**, Prof. Dr. **Edson José Fragiorge**, Prof^a. Dr^a. **Sandra Morelli** e Prof. Dr. **Francis de Moraes Franco Nunes**, pela disponibilidade e atenção para oferecer suas valiosas sugestões a este trabalho.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Mutagênese: Prof. Dr. **Edson José Fragiorge**; Prof^a Dr^a **Silma Maria Alves de Melo**; Prof^a Dr^a **Silmara de Moraes Pantaleão**; Prof^a Dr^a **Wanderlene Blanco Nunes**; MSc. **Denise Gonçalves Pereira**; MSc. **Zaira da Rosa Guterres** e **Alexandre Azenha Alves de Rezende**, pelo convívio, amizade e cooperação. Em especial à MSc **Neila Coelho de Sousa**, pela importante colaboração em momentos decisivos para a conclusão deste trabalho.

Ao Sr. **Paulo Roberto Moderno** e à Sr^a. **Maria Aparecida Vilela**, auxiliares técnicos do Laboratório de Mutagênese (INGEB-UFU), pela dedicação e colaboração na realização dos nossos trabalhos, além da amizade e grande carinho com todos do laboratório.

À Prof^a Dr^a. **Nora Ney Santos Barcelos**, Prof^a MSc. **Eleusa Gallo Rosenberg** e ao Sr. **Anselmo de Oliveira** (Instituto de Biologia – UFU), pela amizade, incentivo, exemplo profissional e humano.

Aos coordenadores de cursos do **Centro Universitário de Caratinga** (UNEC): MSc. **Lamara Laguardia Valente Rocha** (Ciências Biológicas), MSc. **Paulo César Tostes Júnior** (Farmácia), MSc. **Thelma Regina Alexandre Sales Ferreira** (Nutrição), MSc. **Marco Antônio Gomes** (Psicologia) e MSc. **Daniela Fonseca Genelhu** (Medicina) pelo apoio e credibilidade.

Ao Sr. **João Batista de Andrade**, gerente administrativo da Unidade II da UNEC, pela confiança e permissão de utilização de equipamentos de microscopia, em momentos necessários, fora das dependências da UNEC e ao

técnico, Sr. **Jesus Ferreira de Sousa** pela constante presteza no Centro de Estudos de Biologia (CEB – UNEC), que muito colaboraram para a conclusão da análise do material deste trabalho.

Aos colegas de trabalho, professores do Centro Universitário de Caratinga, MSc. **Claudinelli Galvão**, MSc. **Patrícia Silva Santos**, MSc. **Márcio Luiz da Gama Lisboa**, Dr^a **Marciane Oliveira** e Dr. **Sílvio Dolabella**, pelo incentivo, amizade e apoio.

Aos meus ex-alunos, **Thiago Mafra Batista** e **Gleudson Teixeira**, hoje mestrandos (UFOP e UNICAMP, respectivamente), pelo auxílio com material bibliográfico *on-line*, pela consideração e amizade.

Aos meus alunos e orientados do Centro Universitário de Caratinga (UNEC), pelo especial carinho e incentivo.

Aos *personal-trainers* Prof. **Felipe Zago** (Uberlândia) e Prof. **Diego Andrade** (Caratinga) pela amizade, incentivo, paciência e importantes informações sobre o objeto de estudo deste trabalho.

Ao grande companheiro, **Danilo Cunha Nascimento**, pela compreensão e paciência exercitadas nesse período e pelas incontáveis vezes que colaborou de forma simples, mas com ajudas decisivas para que este trabalho acontecesse.

Aos amigos: **Rone Cardoso**, **Alessandra Cristina da Silveira**, **Hélica Macedo**, **Marley Garcia Silva**, **Daniel Maziero**, **Wilson Réu Júnior**, **Bruno Pueyo do Amaral**, **Fabiana Loureiro Pueyo do Amaral**, **Jupyracyara Jandira Carvalho Barros**, **Graziela Ribeiro de Oliveira** e **Paolla Barcelar Cardoso** e à minha prima, **Anna Elisa Saad Campos**, que estiveram presente e me acompanharam nessa trajetória, colaborando com grande incentivo.

À minha tia **Therezinha Lassmar**, que sempre me incentivou o gosto pelo estudo e acompanhou, de perto ou de longe, toda minha trajetória.

Aos meus pais, **Geraldo Antônio Valadares** e **Emília Maria Lassmar Bueno Valadares**, pelo empenho em me amparar em todos os momentos de dificuldades desse período, ao meu irmão, **Victor Saad Bueno Valadares**; aos meus avós, tios e primos, pelo grande apoio e incentivo, sem o qual não alcançaria meus objetivos.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram com a realização deste trabalho e com minha formação.

Muito Obrigado.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU);
- Centro Universitário de Caratinga (UNEC).

*Eu não vou me importar com a maldade de quem nada sabe
E se alguém interessa saber
Sou bem feliz assim
Muito mais do que quem já falou ou vai falar de mim.*

(Maysa)

Lista de Figuras

Figura 1.1	Estrutura comum à maioria dos esteróides derivados sintéticos da testosterona, com indicação das posições na molécula onde se encontram os tipos de variações (A, B e C) das diferentes classes de esteróides anabolizantes (adaptado de Mottram e George, 2000).	15
Figura 1.2	Estruturas químicas dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA) Estanozolol (Winstrol Depot® – WIN) (A); Oximetolona (Hemogenin® – HEM) (B); Decanoato de nandrolona (Deca Durabolin® – DEC) (C).	18
Figura 1.3	Estruturas químicas dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA) constituintes do Durateston® (DUR): Propionato de testosterona (A); Fenilpropionato de testosterona (B); Isocaproato de testosterona (C); Decanoato de testosterona (D).	19
Figura 1.4	Representação esquemática do cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens da linhagem “flr ³ ” (+TM3,Bd ^S /+flr ³) são cruzadas com machos “mwh” (mwh + / mwh +), originando descendentes trans-heterozigotos marcados – MH (+flr ³ /mwh+) e descendentes heterozigotos balanceados – BH (+TM3,Bd ^S /mwh+).	29
Figura 1.5	Pares de asas de <i>D. melanogaster</i> . A – Asas com bordas lisas; característica dos indivíduos da linhagem “mwh”, herdada pelos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH); B – Asas com bordas recortadas (<i>serate</i>); característica dos indivíduos das linhagens “flr ³ ” e “ORR; flr ³ ”, herdada pelos descendentes heterozigotos balanceados (BH).	30
Figura 1.6	Representação esquemática de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de <i>D. melanogaster</i> , em divisão mitótica normal (adaptado de Graf <i>et al.</i> , 1984).	31

- Figura 1.7** Representações esquemáticas de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica, com ocorrência de deleção (**A**), e de mutação de ponto (**B**) levando à formação de manchas mutantes simples do tipo “mwh” (adaptado de Graf *et al.*, 1984). 32
- Figura 1.8** Representações esquemáticas de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica, com ocorrência de recombinação entre os loci *flr*³ e *mwh* (**A**), com formação de mancha simples; e recombinação entre o centrômero e o locus *flr*³ (**B**), com a conseqüente formação de mancha gêmea (adaptado de Graf *et al.*, 1984). 33
- Figura 1.9** Fotografias de pêlos de asa de *D. melanogaster*, ao microscópio óptico de luz (aumento de 400x), mostrando: **A** - mancha simples (contornada pela linha) com pêlos múltiplos (“mwh”) e **B** - mancha gêmea (contornada pela linha) com pêlos em forma de chama (“flr³”), indicados pela seta branca; e pêlos múltiplos (“mwh”), indicados pela seta preta. 34
- Figura 2.1** Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Hemogenin® (HEM) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril). 77

- Figura 2.2** Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Deca Durabolin® (DEC) (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água). 79
- Figura 2.3** Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Durateston® (DUR) (0,195; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água). 81
- Figura 3.1** Fórmulas estruturais dos compostos: **A** – Winstrol Depot® (WIN), estanozolol (Disponível *on-line*: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Estanozolol>. Acesso em 03 outubro 2007); **B** – Etilcarbamato (uretano – URE) (Disponível *on-line*: <http://es.wikipedia.org/wiki/Uretano>. Acesso em 03 outubro 2007). 104
- Figura 3.2** Regressão linear obtida pela correlação direta de dose dependência no percentual de inibição pelas diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) de estanozolol (WIN) nas freqüências totais de manchas mutantes por indivíduos, induzidas pelo uretano (URE 0,891 mg/mL) em células de asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de ativação metabólica (HB) em co-tratamentos de aproximadamente 48 horas. 108

Figura 3.3 Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Winstrol® (WIN) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril). 110

Figura 3.4 Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Winstrol® (WIN) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) associado a uretano (URE) (0,891 mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril). 112

Lista de Tabelas

- Tabela 2.1** Esteróides anabólico-androgênicos derivados de testosterona utilizados nos tratamentos de larvas de *Drosophila melanogaster* para o teste de detecção de mutação e recombinação somática 71
- Tabela 2.2** Freqüências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante Hemogenin® (HEM), e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL) 72
- Tabela 2.3** Freqüências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante Deca Durabolin® (DEC), e seus respectivos controles negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água) e positivo (URE 0,891 mg/mL) 73
- Tabela 2.4** Freqüências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,195; 0,39; 0,79; 1,56 e 3,125 mg/mL) do anabolizante Durateston® (DUR), e seus respectivos controles negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água) e positivo (URE 0,891 mg/mL) 75

Tabela 3.1 Freqüências de manchas mutantes simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG) e gêmeas (MG) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), obtidas por meio do teste de mutação e recombinação somática, após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante estanozolol (WIN), isoladamente, e associado ao uretano (URE) 10Mm, e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL) 106

Tabela 3.2 Freqüências de manchas mutantes simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG) e gêmeas (MG) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste de mutação e recombinação somática, após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante estanozolol (WIN), isoladamente, e associado ao uretano (URE) 10Mm, e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL) 107

Lista de Abreviaturas

BH	Heterozigoto balanceado
CAS	Chemical Abstracts Service
DEC	Decadurabolin® (decanoato de nandrolona)
DUR	Durateston® (associação de propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona)
EAA	Esteróides androgênicos anabólicos
<i>flr</i>³	<i>flare</i> ³
HB	Cruzamento de alta bioativação
HEM	Hemogenin® (oximetolona)
MH	Heterozigoto marcado
<i>mwh</i>	<i>multiple wing hairs</i>
ORR;<i>flr</i>³	Oregon R, <i>flare</i> ³
SMART	Teste de Mutação e Recombinação Somática
ST	Cruzamento padrão
URE	Uretano (etilcarbamato)
WIN	Winstrol Depot® (estanozolol)

Sumário

Apresentação	1
Capítulo I	
Fundamentação teórica	6
Corpo, sexualidade e o uso de esteróides pelo gênero masculino	6
Testosterona e seus derivados sintéticos	12
O citocromo P450 e o metabolismo de agentes xenobióticos	22
Alterações genéticas e a carcinogênese	24
Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)	26
Referências Bibliográficas	35
Capítulo II	
Avaliação genotóxica de esteróides androgênicos anabólicos (EAA) sintéticos derivados da testosterona em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	47
Resumo	50
Abstract	52
Introdução	53
Material e métodos	56
Agentes químicos	56
Obtenção das larvas e tratamentos	56
Preparação das lâminas e análise do material	57
Tratamento estatístico dos dados	58
Resultados e discussão	59
Referências bibliográficas	64

Capítulo III

Efeitos inibidores do estanozolol sobre ação genotóxica do etilcarbamato em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	84
Resumo	87
Abstract	89
Introdução	90
Material e métodos	93
Agentes químicos	93
Linhagens de moscas, cruzamentos e tratamentos	93
Preparação das lâminas e análise do material	94
Análise estatística	95
Resultados e discussão	96
Referências bibliográficas	100

APRESENTAÇÃO

Apresentação

Mais do que a simples utilização de esteróides anabolizantes, ou seus possíveis efeitos genotóxicos e metabólicos, as questões subjetivas relacionadas ao gênero masculino, pouco exploradas, e muitas vezes subestimadas pela nossa cultura, foram as razões da idealização deste trabalho. Os motivos pelos quais um indivíduo encontra nos anabolizantes a solução para os anseios de atender a padrões sociais de estética e virilidade são suficientes para tornar o universo dessa classe de substâncias digno de maior atenção no meio científico.

O desenvolvimento de um estudo para avaliar os efeitos genotóxicos (mutagênicos e recombinogênicos) de esteróides androgênicos anabólicos (EAA), derivados sintéticos da testosterona, visa preencher uma importante lacuna existente entre as poucas informações a respeito dessas substâncias, o indício dos EAA terem efeitos carcinogênicos, sendo que estes apresentam resultados negativos em testes convencionais de genotoxicidade.

Questões como estas levam à discussão de hipóteses, como a possibilidade de uma ação carcinogênica epigenética e não-mutagênica dos EAA; a ineficiência dos testes empregados para detectar tipos específicos de alterações do material genético, como a recombinação gênica; e até mesmo de falhas amostrais nos estudos epidemiológicos, que relacionam a utilização de EAA com a incidência de câncer nos usuários.

Os EAA Winstrol Depot®, Hemogenin®, Deca Durabolin® e Durateston®, utilizados na realização desse trabalho, foram escolhidos levando-se em consideração: informações obtidas em academias de musculação, com profissionais da área de educação física; informações médicas; dados de literatura; possibilidade de aquisição de EAA em farmácias e academias de fisiculturismo; realização de experimentos que permitem avaliar comparativamente o potencial genotóxico dos mesmos; possibilidade de correlacionar a estrutura química com a atividade genotóxica.

A escolha do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*, como método

investigativo, foi devida, além de todas as suas vantagens de baixo custo, rapidez e confiabilidade de resultados, à possibilidade da detecção de recombinações gênicas somáticas. Testes tradicionais já empregados para avaliação de esteróides não detectaram efeitos genotóxicos, mas os mesmos têm a recombinação gênica como um “ponto cego”, não detectando esse tipo especial de alteração genética de grande importância na carcinogênese. Assim, um efeito positivo, recombinogênico, detectado pelo SMART, responderia à questão da relação de efeitos carcinogênicos de uma substância química, com esse tipo específico de alteração genética, assim como um efeito negativo, reforçaria a idéia de causas epigenéticas e não-mutagênicas.

Outra razão que favoreceu a escolha do SMART, como meio de investigação, foi a possibilidade de avaliar a ativação metabólica dos esteróides pelo sistema enzimático citocromo P450, responsável pelo metabolismo de agentes xenobióticos, presente na *D. melanogaster*.

No caso especial de uma das substâncias avaliadas, o Winstrol Depot® (WIN), a informação prévia de que seu constituinte, estanozolol, apresenta interação com o citocromo P450, motivou a realização de um teste complementar onde foi verificada a interferência dessa interação na ativação metabólica do uretano (URE - etilcarbamida), um agente com propriedades mutagênicas comprovadas, que tem sua ação potencializada pela presença do citocromo P450. A detecção dessa interação inibitória do citocromo P450 reforça a possibilidade de ação epigenética e não-mutagênica dessa substância química na carcinogênese, pois, a inibição do citocromo P450, possibilitaria a ação de eventuais xenobióticos carcinogênicos, não metabolizados.

O estudo de EAA sintéticos da testosterona entra em um campo, onde há muito a ser explorado, e que desperta interesse em diversas áreas, com relações científicas multidisciplinares, pois, não serão descobertas de mecanismos de ação genotóxica, ou efeitos epigenéticos de alterações metabólicas indesejáveis, e até mesmo a confirmação de efeitos carcinogênicos, que farão reduzir o grande número de indivíduos que aderem, a cada dia, ao uso dos anabolizantes, pois as razões pelas quais essas

substâncias são utilizadas envolvem relações complexas de auto-imagem e questões culturais que superam o medo e o risco de sua utilização.

Este trabalho, enquanto pesquisa básica, espera contribuir como alicerce para outras descobertas sobre os anabolizantes, que ofereçam formas para minimizar seus efeitos indesejáveis e tornar seu uso mais seguro, ou então, argumentos para reforçar o controle da sua comercialização e o investimento em campanhas educativas para conscientizar usuários, efetivos ou em potencial, sobre seus riscos, uma vez que é fácil julgar o que é certo ou errado quando se olha algo apenas por um único ângulo, cartesiano e traçado sobre verdades absolutas, inquestionáveis e imutáveis. Mas, a realidade é que se vive um momento de crise e mudança de paradigmas, quando chegamos à necessidade de refletir e repensar razões, atitudes e escolhas.

Para a apresentação deste trabalho, o mesmo foi dividido em três capítulos:

Capítulo 1 - Apresenta uma revisão geral da literatura, com informações sobre: o corpo, a sexualidade, e o uso de esteróides pelo gênero masculino; as características físico-químicas e efeitos biológicos dos EAA sintéticos derivados da testosterona, Winstrol® (WIN – estanozolol); Hemogenin® (HEM – oximetolona); Deca Durabolin® (DEC – decanoato de nandrolona); e Durateston® (DUR – associação de propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona); os sistemas enzimáticos responsáveis pelo metabolismo de agentes xenobióticos; assim como sobre a *D. melanogaster* e o teste para detecção de mutação e recombinação somática.

Capítulo 2 - Apresenta o manuscrito denominado “Avaliação genotóxica de esteróides androgênicos anabólicos (EAA) sintéticos derivados da testosterona em células somáticas de *Drosophila melanogaster*”, a ser enviado para publicação na revista científica *Environmental and Molecular Mutagenesis*, no qual, foram avaliados os EAA Hemogenin® (HEM - oximetolona); Deca Durabolin® (DEC - decanoato de nandrolona); e Durateston® (DUR - associação de propionato de testosterona, fenilppropionato de testosterona,

isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona), por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *D. melanogaster*.

Capítulo 3 - Apresenta o manuscrito denominado “Efeitos inibidores do estanozolol sobre ação genotóxica do etilcarbamato em células somáticas de *Drosophila melanogaster*”, a ser enviado para publicação na revista científica *Environmental and Molecular Mutagenesis*, que teve como objetivo avaliar a genotoxicidade do WIN quando administrado isoladamente, e a sua antigenotoxicidade quando associado ao etilcarbamato (URE – uretano), por meio do SMART de asas de *D. melanogaster*.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Corpo, sexualidade e o uso de esteróides pelo gênero masculino

A era moderna tem como uma de suas características a razão de produtividade, observada na busca insana por uma eficiência sobre-humana refletida na necessidade da obtenção de maior quantidade de resultados, em menor espaço de tempo, que é favorecida pelo desenvolvimento da tecnologia em todas as áreas da ciência (Santos, 1997).

Buscando atender as exigências da modernidade, vivemos uma constante busca pela superação de expectativas, pois, nos vemos submetidos a constantes avaliações, algumas externas, e outras (a maioria), vindas de nós mesmos. Desta forma, o corpo e a sexualidade são também submetidos a constantes provações, enquadrando o indivíduo em um padrão definido por Lowen (1988) como “sofisticação da sexualidade”.

De acordo com Gaiarsa (1986), tanto os adultos quanto as crianças gostam muito de fazer pose quanto às suas virtudes e, de regra, têm consciência muito limitada de seus próprios defeitos, buscando acreditar em sua plena perfeição.

O indivíduo moderno, sexualmente sofisticado, busca mais atender a uma expectativa de uma “avaliação” de seu corpo e de seu desempenho, a atingir sua própria satisfação, pois, este sim, seria seu verdadeiro sucesso. É precisamente no medo do fracasso, por não corresponder às expectativas, que o homem sexualmente sofisticado revela a presença de culpas e aflições básicas quanto à sexualidade (Lowen, 1988). Em função de atender tantas exigências, provoca-se ansiedade e insegurança na vida humana. Para muitos homens, a vida sexual é um “blefe”, pois lutam desesperadamente para manter a imagem da infalível “máquina masculina”, tornando a vida sexual competitiva, voltada mais para a aparência e o desempenho, do que para o próprio prazer (McCarty, 1981).

O desempenho dos papéis de gênero são estabelecidos pela sociedade, existindo sempre uma linha, mais ou menos comum, a todos os homens e mulheres, em termos de comportamento. As diferenças vão acontecer de cultura para cultura ou de época para época (Costa, 1994). O mito da masculinidade sempre existiu na história da humanidade, em toda sociedade patriarcal, não só relacionado à auto-imagem corporal, como também à virilidade (Santos, 2000).

O porquê de se comportarem assim faz parte de uma tradição muito antiga, de uma visão de mundo como completo em si mesmo, com suas próprias regras, códigos, significados e respostas para todas as perguntas. Certamente não foram os homens de hoje, como indivíduos, que formularam a idéia de “sexualidade masculina” tal como nós conhecemos. Os homens de hoje nasceram numa sociedade com uma carga imensa de imperativos culturais que, por meio da censura ou do aplauso, os adaptaram a certos padrões de comportamento e pensamento. Diferenças situam um homem fora do grupo de “homens” e tornam a vida difícil. Eventualmente, muitos homens parecem perder a capacidade de distinguir entre seus próprios sentimentos e essa ideologia violentamente reforçada que impregna a cultura. Embora estas definições culturais não tornem os homens particularmente felizes, a maioria sente-se compelida a continuar exercendo esse papel (Hite, 1981).

No mundo atual se vê uma valorização de músculos e de força, numa simbologia de virilidade, competência e de conquistas. O carro, a velocidade e o estilo são novos símbolos de poder masculino, como também o dinheiro e a casa em que ele reside. Também é importante para a auto-estima do homem, mostrar que ainda é bastante forte seu vigor sexual (Santos, 2000).

Uma desvantagem de grande importância na vida do homem, e que o coloca sempre numa situação angustiante, é a necessidade de esconder sentimentos e “mostrar-se forte”. O que acontece, é que o próprio conceito de ser forte é mal compreendido. Forte, não é o indivíduo que suporta a dor sem demonstrar seus sentimentos. Essa é, na verdade, a pessoa que não consegue demonstrar suas emoções. Forte, é quem reconhece que tem medo e que precisa de muita coragem para enfrentar os seus fracassos. O homem insiste na imagem que lhe foi transmitida desde a infância, de que é capaz de vencer

todos os obstáculos. Com isso, não consegue humanizar suas relações com as pessoas, perde a oportunidade de falar de si próprio e de externar sentimentos que lhe incomodam. Essa angústia impede que trocas afetivas importantes sejam realizadas. O isolamento dentro de si próprio constitui o perfil típico do indivíduo que, em determinado momento da vida, começa a ter problemas de ordem psico-somática, como úlcera duodenal, hipertensão arterial, infarto ou impotência sexual. O homem que não revela seus sentimentos e preocupações, e não descarrega suas tensões, torna-se reprimido e enclausurado dentro de suas emoções (Costa, 1993).

Os homens da geração atual sofrem de uma baixa auto-estima, resultante das cobranças da sociedade e da mídia para que tenham corpos perfeitos. Esse fenômeno é denominado de “Complexo de Adônis”, também chamado de “bigorexia” ou “anorexia nervosa reversa”. Faz com que os homens, cada vez mais, possuam uma auto-imagem distorcida de seus corpos e sintam-se deprimidos por isso (Pope *et al.*, 1999).

É exigido do homem um maior cuidado com a aparência, diante da idéia de que, se estiver em melhor forma física e bem apresentável, terá maior chance no mercado de trabalho, mais disposição nas horas de lazer, maior satisfação consigo próprio e, acima de tudo, maior sucesso na atração sexual. Com isso, busca atender ao padrão de beleza aceito como ideal pela sociedade. Aqueles que não conseguem se adequar a esse padrão, desenvolvem um sentimento de inferioridade, ficando inibidos nas iniciativas de conquistas sexuais e profissionais, devido à baixa auto-estima (Valadares, 2001).

Mais do que nunca, os homens estão lutando com a mesma e enorme pressão para obter a perfeição física, à qual eram submetidas anteriormente as mulheres. Do halterofilismo compulsivo, até o uso de esteróides, dos implantes de cabelo até a cirurgia plástica, cada vez maior número de homens está procurando satisfazer as exigências por músculos, pele e cabelos perfeitos, ultrapassando a linha do interesse normal em direção à obsessão patológica. Esta nova obsessão com a aparência aflige homens de todas as idades e com todos os tipos de vida. Em suas formas mais severas, podem criar uma

ameaça à saúde tão insidiosa e mortal quanto os distúrbios da alimentação, como a bulimia e anorexia, para mulheres (Pope *et al.*, 1999).

Com os movimentos feministas, a identidade feminina está relatada, discutida e apresentada em muitos estudos e pesquisas, em especial, desde a década de 1960. No entanto, só a partir da década de 1990, estudos e publicações voltadas para questões masculinas vêm ganhando atenção e espaço (Rodrigues Jr., 1995).

Goldenberg (2005) destaca o paradoxo que o culto ao corpo gera nesta cultura das camadas médias urbanas. Quanto mais se impõe o ideal de autonomia individual, mais aumenta a exigência de conformidade aos modelos sociais do corpo. Considerando verdade que o corpo tenha se emancipado de muitas de suas antigas prisões sexuais, ele se encontra, atualmente, submetido a novas coerções estéticas. A obsessão com a magreza, a multiplicação das academias de musculação, o uso de anabolizantes, são apenas alguns dos exemplos que testemunham o poder de normalização (ou padronização) dos modelos, um desejo maior de conformidade estética que se choca com o ideal individualista e sua exigência de singularização dos sujeitos.

Com o desenvolvimento de técnicas de treinamento, conhecimento nutricional e administração hormonal, o culto ao corpo passou a ser supervalorizado e, uma de suas conseqüências, é um padrão estético baseado no desenvolvimento muscular. Sobretudo, em países de clima tropical, como o nosso, onde o corpo fica mais a mostra, esse culto é ainda mais exacerbado, se expressando na possibilidade de desenvolver ao máximo o potencial da massa muscular como padrão de beleza. A idéia de que um indivíduo forte é um indivíduo saudável, ultrapassou a esfera do bom senso e mascarou as conseqüências do uso de esteróides anabolizantes, e seu emprego passou a ter um caráter totalmente secundário ao objetivo principal de obter músculos (Neves *et al.*, 2005).

Em casos mais graves de distorção da auto-imagem, temos a dismorfia muscular, um subtipo do transtorno corporal que ocorre principalmente em homens que, apesar da grande hipertrofia muscular, consideram-se pequenos e fracos. É um quadro ainda pouco estudado, mas que parece ser prevalente entre indivíduos do sexo masculino. Sua gênese pode ser parcialmente

explicada por fatores ambientais como uma crescente pressão exercida em grande parte pela mídia para que os homens tenham um corpo forte e musculoso, acarretando um aumento na incidência do transtorno. A dismorfia muscular está associada a sofrimento e danos em várias áreas de funcionamento do indivíduo, com prejuízos sociais, ocupacionais e recreativos, além de sua presença aumentar o risco de uso de esteróides anabolizantes. Apesar de seu tratamento ainda não estar definido, é importante que o quadro seja identificado e que as diretrizes terapêuticas atualmente disponíveis sejam aplicadas (Assunção, 2002).

Diante dessa crescente valorização do corpo nas sociedades de consumo pós-industriais, exibida nos meios de comunicação de massa, um número crescente de jovens e adolescentes também se envolve com o uso de esteróides anabolizantes, na intenção de desenvolver rapidamente massa muscular, como uma tentativa precoce de uma identidade de destaque em seus grupos (Coutrine, 1995).

O consumo dessas substâncias, especialmente entre jovens atletas, tem sido registrado com frequência ascendente em vários países (Perry *et al.*, 1992; Nilson, 1995; Scott *et al.*, 1996; Lise *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos, um estudo populacional estimou em mais de um milhão o número de usuários de anabolizantes (Yesalis *et al.*, 1993).

Tricker *et al.* (1989) estabeleceram um perfil de usuários e não-usuários de esteróides anabolizantes nos estados do Kansas e Missouri (EUA), detectando 54% de usuários entre o público fisiculturista do gênero masculino e, 10%, do feminino. Em relatório do *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) é informado um aumento de 50% entre os estudantes de cursos secundários (*high school*) que utilizam estas substâncias em um tempo de quatro anos. O aumento do uso de suplementos alimentares e anabolizantes levou o governo norte-americano a lançar uma campanha nacional para alertar os jovens dos perigos associados à sua utilização (Durant *et al.*, 1993; Yesalis *et al.*, 1997).

No Brasil, estudos que abordam o uso de anabolizantes são escassos, não existindo dados epidemiológicos que indiquem a extensão do consumo dessas substâncias. Alguns indícios, no entanto, sugerem que o uso de anabolizantes é crescente entre os jovens e adolescentes pertencentes às

diferentes classes sociais, podendo representar, em breve, um importante problema de saúde pública (Manetta e Silveira, 2000; Araujo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Souza e Fisberg, 2002; Silva *et al.*, 2003; De Micheli e Formigoni, 2004; Carreira Filho e Martins Filho, 2005; Neves *et al.*, 2005; Dal Pizzol Tda *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2006).

Outra questão importante dentro do gênero masculino é a necessidade de manter-se jovem, além da aparência forte e saudável, ainda com as atividades mentais, físicas e sexuais inalteradas. O processo de envelhecimento do homem é associado com o declínio progressivo na produção androgênica. Só recentemente, no entanto, um significativo interesse foi desenvolvido em torno da importância do problema, que é conhecido como climatério masculino, andropausa, declínio androgênico no homem que envelhece, ou, mais apropriadamente, deficiência androgênica no envelhecimento masculino (Cairolí, 2004).

O termo “andropausa”, embora biologicamente inoportuno e não muito bem definido, representa transformações físicas e emocionais que, mesmo relacionadas ao envelhecimento em geral, estão associadas principalmente a uma significativa alteração hormonal (Morales *et al.*, 2004).

Diante de uma condição controversa e pouco conhecida, diversos estudos procuram por dados contundentes na busca de uma base sólida para a discussão de questões relacionadas à andropausa. Conseqüências da deficiência de testosterona parecem ser mais salientes em termos físicos que psicológicos, quando testadas cientificamente. Tratando-se especificamente de terapia de reposição hormonal, ainda se procura o androgênio ideal, específico para órgãos alvo e sem efeitos direcionados a outras funções fisiológicas. O papel dos níveis de testosterona é primordialmente importante na caracterização do quadro de andropausa, porém, os sinais e sintomas do envelhecimento são de origem multifatorial (Molle *et al.*, 2004).

Na maioria das vezes, não se verifica no sexo masculino um declínio abrupto das funções gonadais, como ocorre no sexo feminino. No homem, com o passar do tempo, ocorre progressiva redução da atividade sexual, diminuição da libido, diminuição da força e massa muscular. Não se afigura como completamente benéfica a terapêutica com suplementação androgênica em

homens idosos, ainda mais na eminência de possíveis relações entre os androgênios e o câncer de próstata (Silva, 2006).

A testosterona é há muito conhecida pelos seus efeitos anabolizantes, no entanto, não se sabe se o declínio da força e massa muscular está relacionado à queda paralela de testosterona no envelhecimento. Por outro lado, sabe-se que a reposição hormonal com testosterona provocará uma melhora tanto na força muscular e na massa óssea (Cairolí, 2004).

A utilização de esteróides derivados de testosterona pode resolver também o problema da diminuição da libido, mas, não há comprovações de que solucione problemas de disfunção ou impotência erétil, devido justamente às múltiplas origens das disfunções da ereção (Molle *et al.*, 2004).

Distúrbios endócrinos correspondem a cerca de 3% a 5% dos casos de disfunção erétil. Na maioria dos casos, o distúrbio hormonal guarda relação com a baixa dosagem de testosterona no sangue (hipogonadismo), ocasionada geralmente por condições mórbidas. Um tema muito controverso atualmente é a diminuição dos níveis sangüíneos da testosterona em homens acima de 50 anos, sem doença endócrina detectável, sendo um fenômeno que se manifesta em aproximadamente 15% dos indivíduos do gênero masculino. A indicação do tratamento com reposição hormonal tem sido motivo de discussão e controvérsias em congressos e publicações médicas (Gromatzky, 2000).

Testosterona e seus derivados sintéticos

Nos humanos, a testosterona constitui o androgênio mais importante secretado pelo testículo. No homem são produzidos diariamente 8,0 mg de testosterona, sendo aproximadamente 95% sintetizada pelas células de Leydig, nos testículos, e 5% pelas supra-renais. Os níveis plasmáticos de testosterona no homem são em torno de 0,6 µg/dL após a puberdade e, geralmente, declinando depois dos 50 anos de idade do indivíduo (Katzung, 2006).

No período embrionário, a partir da oitava ou nona semana, as células de Leydig fetais produzem testosterona, que estabiliza os ductos de Wolff, permitindo sua diferenciação em epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais e ductos ejaculatórios. A testosterona é convertida pela enzima 5 α -reductase tipo 2 em diidrotestosterona, que viriliza os rudimentos genitais externos entre a nona e a décima segunda semana de gestação (Maciel-Guerra e Guerra Júnior, 2002).

Nos tecidos, a diidrotestosterona constitui o principal androgênio ativo. A conversão da testosterona em estradiol pela aromatase P450 também ocorre em alguns tecidos, incluindo o tecido adiposo, o fígado e o hipotálamo, onde pode ser importante na regulação gonadal (Katzung, 2006).

Os hormônios são, em vários casos, substâncias que ativam a transcrição de genes específicos. No caso dos esteróides, devido à sua natureza lipídica, podem penetrar na célula por lipossolubilidade e se associarem aos receptores no núcleo. Estas moléculas podem se ligar ao DNA em regiões promotoras e acentuadoras de transcrição (Mottran e George, 2000).

A partir do progressivo entendimento da regulação da biossíntese e da secreção dos andrógenos, bem como de seus efeitos, teve lugar a aplicação terapêutica destas substâncias. Inicialmente, nos tratamentos de diferentes estados hipogonadais masculinos, e, por extensão, na oligospermia. Em seguida, surgiu sua utilização como anabolizante para o sexo masculino e, com uma procura não tão expressiva, pelo público feminino. Mais recentemente, como consequência do melhor conhecimento das modificações na espermatogênese sob ação androgênica, admite-se a especulação e a pesquisa em torno da hipótese de sua utilização como anticoncepcional masculino (Silva, 2006).

Em 1888, foram realizados experimentos onde extratos de testículos de animais eram injetados em cães e humanos, promovendo um aumento de força muscular, apetite e funcionamento do trato intestinal, mas só em 1920 intensificou-se a pesquisa com hormônios e os mecanismos de ação e regulação do sistema endócrino. Os esteróides anabolizantes foram desenvolvidos primeiramente da década de 1930, onde cientistas alemães

utilizavam em cães e em seus próprios soldados na segunda guerra mundial, sendo acusados de desenvolver pesquisas com humanos prisioneiros para o desenvolvimento dos anabolizantes. Muitos resultados destes experimentos se perderam por nunca terem sido publicados, havendo relatos de que anabolizantes eram administrados aos soldados para aumentar a agressividade das tropas. Na década de 1950, atletas russos e europeus passaram a fazer uso de esteróides, considerando os benefícios que estes proporcionavam em competições e, uma década mais tarde, os esteróides estavam disponíveis no mercado (Santos, 2003).

Os esteróides anabólico-androgênicos, comumente chamados de anabolizantes, são substâncias derivadas sintéticas do hormônio masculino testosterona, geralmente extraído de testículos de bovinos e modificadas em laboratório. Esta substância promove o anabolismo protéico, um aumento da síntese de proteínas no organismo, que associada a exercícios físicos, aumenta a força e a massa muscular, mudando a aparência do corpo sem grandes esforços. Em doses altas, os anabolizantes aumentam o metabolismo basal, o número de hemácias e a capacidade respiratória. Estas alterações provocam ainda uma redução da taxa de gordura corporal (Muniz *et al.*, 1997; Iriart e Andrade, 2002).

Os esteróides anabólico-androgênicos são originados de três tipos de alterações na molécula de testosterona para minimizar ou excluir o metabolismo hepático destas substâncias químicas, sendo que estas alterações também definem as classes de anabolizantes (Mottran e George, 2000). A estrutura básica da testosterona com os tipos de modificações que a mesma pode sofrer na síntese dos diferentes tipos de esteróides está representada na **Figura 1.1**.

As modificações na molécula objetivam alterar suas propriedades, aumentando a ação anabólica (síntese protéica) em relação aos efeitos androgênicos (acentuação dos caracteres sexuais masculinos secundários) deste hormônio (Muniz *et al.*, 1997; Kimtz *et al.*, 1999; Mottram e George, 2000; Santos, 2003; Neves *et al.*, 2005).

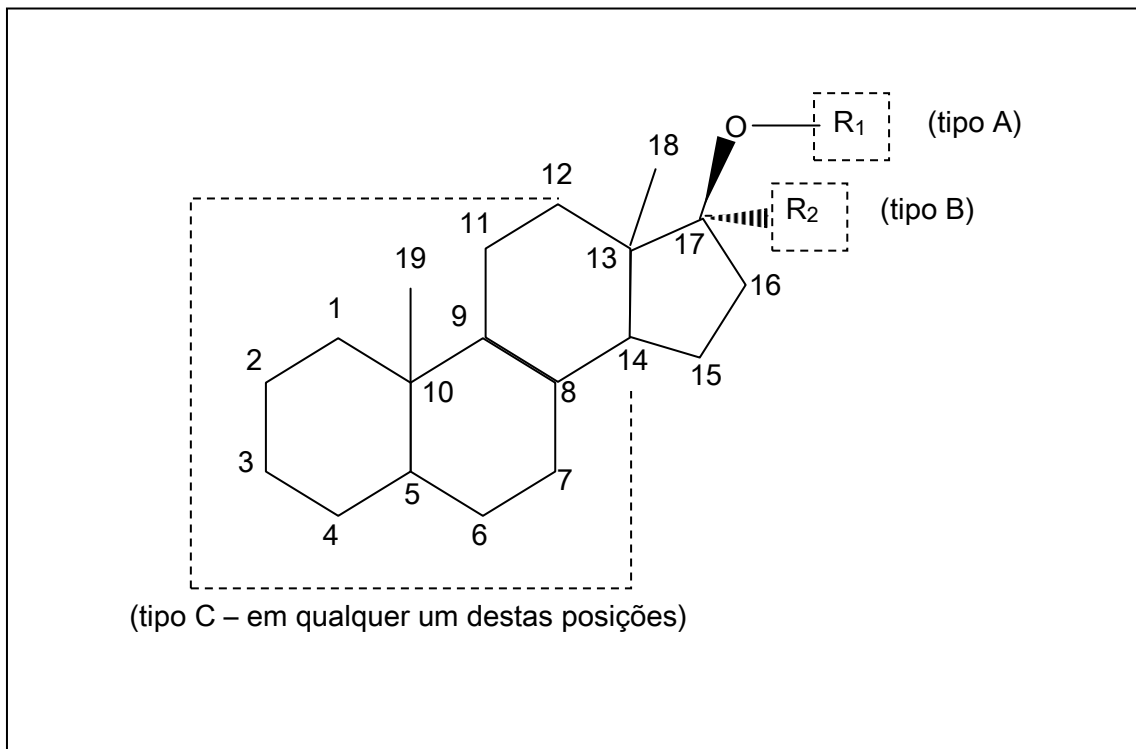


Figura 1.1 – Estrutura comum à maioria dos esteróides derivados sintéticos da testosterona, com indicação das posições na molécula onde se encontram os tipos de variações (A, B e C) das diferentes classes de esteróides anabolizantes (adaptado de Mottram e George, 2000).

As modificações na molécula de testosterona podem ser diferenciadas em grupos:

- **Classe A** – esteróides produzidos via esterificação do grupo 17 β -hidroxil, como o propionato, fenilpropionato, cipionato e enantato de testosterona. Estes derivados androgênicos são mais solúveis em veículo lipídico, utilizado para injeções. A testosterona, quando injetada em uma solução de óleo, é rapidamente absorvida, metabolizada e excretada.
- **Classe B** – análogos alquilados na posição 17 α , como a metiltestosterona.

- **Classe C** – são anabolizantes produzidos por diferentes alterações em qualquer posição nos anéis de sua estrutura (ex. estanozolol e oximetolona).

As classes B e C são mais utilizadas em preparações via oral. Apresentam boa absorção e excreção rápida, porém, maior toxicidade hepática que os injetáveis (Lise *et al.*, 1999; Mottran e George, 2000; Santos, 2003).

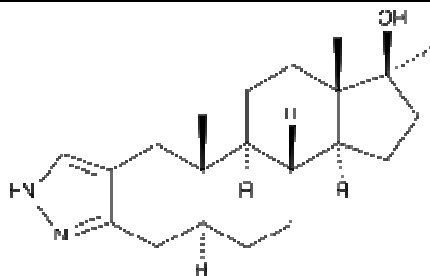
Winstrol Depot[®] (WIN), apresentado como solução injetável, em ampolas de 1 mL contendo 50 mg de estanozolol (CAS 10418-03-8), distribuído pelo Laboratório Zambon S.A. (Barcelona, Espanha). É um derivado sintético do hormônio testosterona, indicado no tratamento de angioedema hereditário, para diminuir a frequência e a severidade das crises (Sanofi-Synthelabo, 1999) e também para o tratamento de anemias (Reynolds e Prasad *apud* Rendic e Ruf, 1988), asma, artrite reumatóide, anorexia, fraturas de lenta consolidação, queimaduras extensas e períodos pré e pós-operatório. É considerado um esteróide de efeito androgênico e efeitos colaterais relativamente baixos. Em doses altas, pode causar danos ao fígado (Santos, 2003). Sua fórmula estrutural é apresentada na **Figura 1.2A**.

Hemogenin[®] (HEM), apresentado na forma de comprimidos contendo 50 mg de oximetolona (CAS 434-07-1), distribuído pela Aventis Pharma Ltda. (Suzano – SP, Brasil). É um esteróide de uso oral, indicado para o tratamento de anemias causadas pela produção deficiente de eritrócitos e mielofibrose (Lima, 2004). É um forte anabolizante, mas com ação androgênica alta, comparada à testosterona. Proporciona rápido ganho de força e massa muscular, mas, é tóxico ao fígado, causa retenção de líquidos, aumento de pressão arterial, acne, ginecomastia, problemas estomacais e calvície, devido à elevação dos níveis de diidrotestosterona (Santos, 2003). Sua fórmula estrutural é apresentada na **Figura 1.2B**.

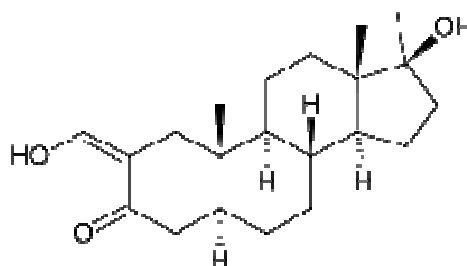
Deca Durabolin[®] (DEC), apresentado como solução injetável, em ampolas de 1 mL contendo 50 mg de decanoato de nandrolona (CAS 360-70-03), distribuído pelo Laboratório Organon (São Paulo – SP, Brasil). É indicado como coadjuvante para terapias específicas e medidas dietéticas, em

condições patológicas caracterizadas por balanço de nitrogênio negativo, como doenças debilitantes crônicas, terapias prolongadas com glicocorticóides e após grandes cirurgias, traumas e osteoporose. Em mulheres, apresenta efeitos de virilização, aumento da libido, aumento de pêlos pubianos, hipertrofia clitoriana e amenoréia; para pré-puberes do sexo masculino, aumento fálico e da frequência de ereções, inibição da espermatogênese; fechamento epifisário prematuro e retenção de água e sais (Lima, 2004). É o esteróide mais utilizado, com efeitos androgênicos e anabólicos, muitas vezes administrado em associação com outras substâncias químicas (Santos, 2003). Sua fórmula estrutural é apresentada na **Figura 1.2C**.

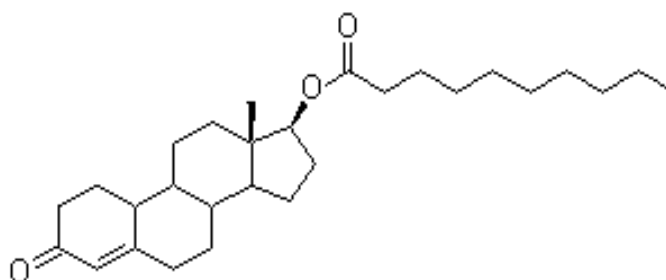
Durateston[®] (DUR), apresentado como solução injetável, em ampolas de 1 mL, distribuído pelo Laboratório Organon (São Paulo – SP, Brasil). Combina a ação de quatro compostos derivados por esterificação do grupo 17 β -hidroxil da testosterona: propionato de testosterona, 30 mg (CAS 57-85-2); fenilpropionato de testosterona, 60 mg (CAS 1255-49-8); isocaproato de testosterona, 60mg (CAS 15262-86-9); e decanoato de testosterona, 100 mg (CAS 5721-91-5). É utilizado para reposição da testosterona em distúrbios hipogonadais no homem, como após castração, eunucoidismo, hipopituitarismo, impotência endócrina, sintomas do climatério masculino (diminuição da libido e decréscimo da atividade mental e física), infertilidade devido a distúrbios da espermatogênese e osteoporose por origem deficitária de andrógenos (Lima, 2004). Apresenta ação imediata e por tempo prolongado em ganho de massa muscular e força (Santos, 2004). As fórmulas estruturais dos quatro compostos presentes nesta substância são apresentadas na **Figura 1.3**.



(A) Estanozolol (CAS: 10418-03-8)



(B) Oximetolona (CAS: 434-07-1)



(C) Decanoato de nandrolona (CAS: 360-70-03)

Figura 1.2. Estruturas químicas dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA) Estanozolol (Winstrol Depot® – WIN) (A); Oximetolona (Hemogenin® – HEM) (B); Decanoato de nandrolona (Deca Durabolin® – DEC) (C).

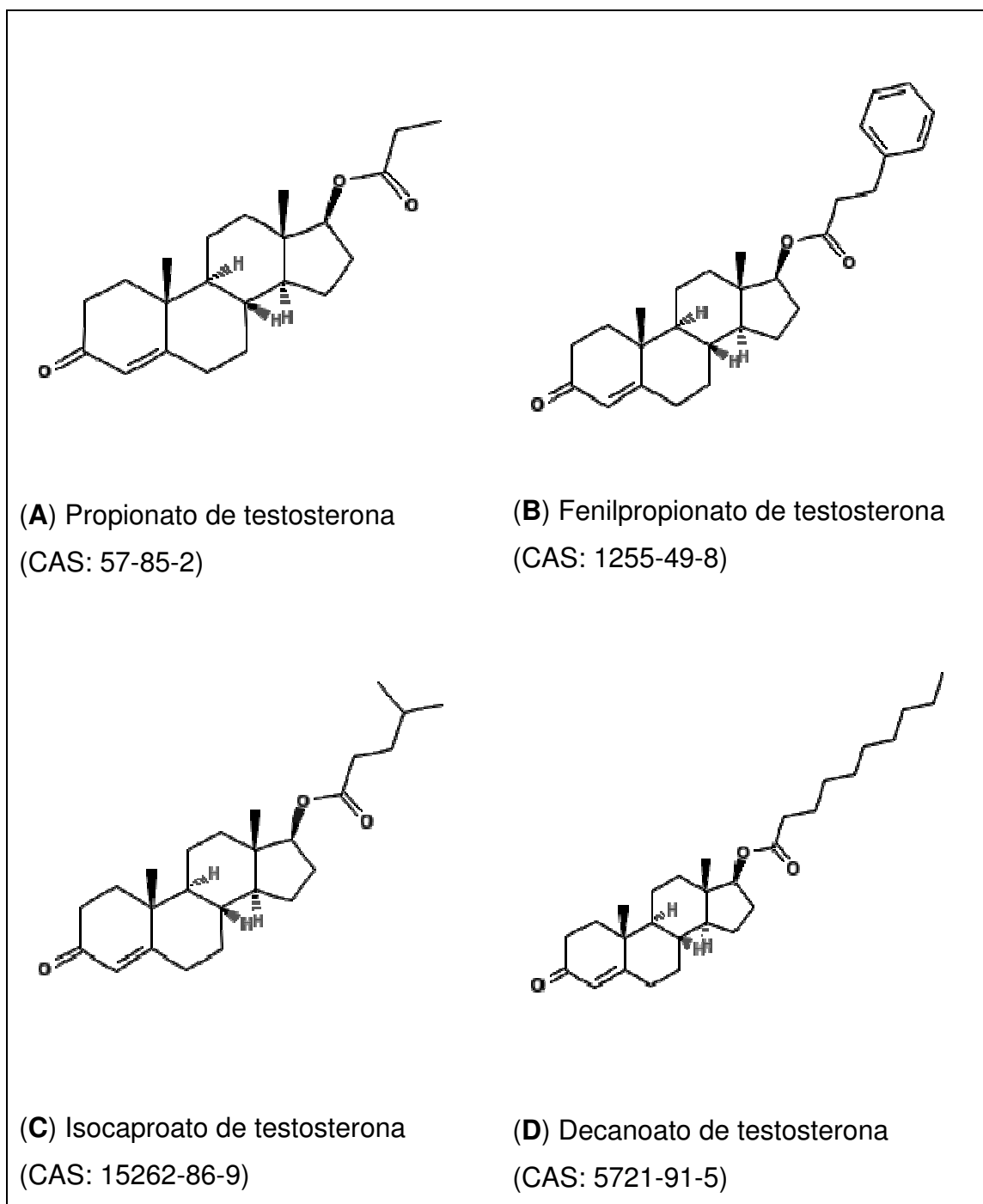


Figura 1.3. Estruturas químicas dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA) constituintes do **Durateston®** (DUR): Propionato de testosterona (A); Fenilpropionato de testosterona (B); Isocaproato de testosterona (C); Decanoato de testosterona (D).

A Comissão Médica do Comitê Olímpico Internacional considera os esteróides anabolizantes como agentes de doping e proíbe seu uso dentro do atletismo, havendo controle e punição severa de atletas que fazem uso de qualquer anabolizante para melhorar sua performance (Rendic e Ruf, 1988; Huenerbein *et al.*, 2003).

De acordo com o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, 2007), são desenvolvidos nos Estados Unidos da América do Norte (USA) mais de 100 tipos de esteróides anabolizantes, que requerem prescrição médica para serem usados legalmente, mas não há estimativas de quantidade e controle de uso e produção, quando estes são sintetizados ilegalmente em laboratórios clandestinos.

Entre os fisiculturistas, a principal razão do uso de esteróides anabolizantes está relacionada ao fato de que estas substâncias são importantes para vencerem competições e, ainda, é motivada por dados consistentes de relatórios de ganhos significativos de força e musculatura pelos usuários (Tricker *et al.*, 1989).

Estudos indicam que o aumento mais significativo da massa muscular e da força, durante a administração de esteróides anabolizantes são observadas apenas em atletas que realizam trabalho de treinamento intensivo, com continuidade, e mantendo ainda uma dieta hiper-calórica e rica em proteínas e aminoácidos (Kibble e Ross, 1987).

O uso inadequado de anabolizantes pode causar sérios prejuízos à saúde, como problemas cardíacos, hipertensão arterial, distúrbios psicológicos provocados pelo aumento da agressividade, complicações hepáticas e redução dos hormônios sexuais. No homem, pode haver diminuição da produção de espermatozóides, além da atrofia dos testículos e aumento das mamas (ginecomastia). As mulheres podem apresentar aumento do clitóris e crescimento excessivo de pêlos (Mottran e George, 2000; Katzung, 2006; Silva, 2006).

Ilígo *et al.* (2000) descrevem diversas formas de utilização dos esteróides anabolizantes por esportistas e, ainda, efeitos colaterais relatados ou apresentados pelos atletas usuários. As formas de administração combinam

diversos tipos de substâncias em doses elevadas, ocorrendo em períodos denominados como “ciclos”.

A lista dos prejuízos é extensa e incompleta, porque, como não há controle, os jovens e atletas, no anonimato, usam doses excessivas e com diversas associações de anabolizantes, assim, dificultando a identificação de efeitos colaterais que podem ainda surgir com o tempo de uso (Muniz *et al.*, 1997).

Iriart e Andrade (2002) descrevem a falta de informações sobre a extensão dos danos à saúde, decorrentes do uso de anabolizantes por parte dos usuários, mostrando que, para muitos, o desejo de desenvolver massa muscular e alcançar o corpo ideal se sobrepõe ao risco de efeitos colaterais. De modo geral, a pouca informação desses usuários sobre esses produtos, suas propriedades farmacológicas e efeitos colaterais, são oriundas da experiência pessoal, da observação dos usuários das academias e dos relatos de casos vivenciados por amigos ou conhecidos. Sintomas menores e temporários, tais como, cefaléia, náuseas, tonturas, irritabilidade, acne, febre e aumento dos pêlos corporais, com o tempo, são considerados “normais” pelos usuários de anabolizantes, não transparecendo preocupações com os possíveis efeitos em longo prazo que o uso contínuo dessas substâncias possa produzir.

Alguns estudos discutem uma possível relação causa-conseqüência da utilização de hormônios sexuais (estradiol, testosterona e seus derivados) com a ocorrência de alguns tipos de tumores, especialmente de fígado e próstata em humanos, e em experimentos com animais (Carrasco *et al.*, 1985; Taylor, 1987; Anthony, 1988; Froehner *et al.*, 1999; Socas *et al.*, 2005; Bosland, 2006; Giannitrapani *et al.*, 2006; Ricke *et al.*, 2006; Gorayski, *et al.*, 2007), ao mesmo tempo em que estes hormônios não apresentaram potencial mutagênico em testes com *Salmonella*/microsoma e linhagens de células V79 de hamster chinês (Lang e Redmann, 1979; Lang e Reimann, 1993) e testes de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e micronúcleo em medula óssea de camundongos (Reimann *et al.*, 1996), sugerindo um efeito carcinogênico destas substâncias químicas por ação epigenética e não-genotóxica.

Resultados não genotóxicos também foram encontrados para o anabolizante Hemogenin® (HEM), oximetolona, por meio do teste de troca entre cromátides irmãs em linfócitos humanos (Ahmad *et al.*, 2003); e por Holden *et al.* (1999) em ensaios com microrganismos e com células de mamíferos (aberrações cromossômicas em linfócitos humanos *in vitro*, teste de micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico de roedores).

Citocromo P450 e o metabolismo de agentes xenobióticos

A exposição diária a uma grande variedade de agentes xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) pode ser inadvertida, acidental, e às vezes inevitável, levando à absorção não intencional e inconsciente destes, através dos pulmões e pele, ou ingestão, como o que acontece com contaminantes presentes nos alimentos e na água. Por outro lado, a exposição pode ser deliberada e consciente, como acontece, por exemplo, na forma de medicamentos, com fins terapêuticos ou não. Alguns agentes xenobióticos são inofensivos, outros, porém, podem provocar respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica. Essas respostas biológicas geralmente dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (Oshima-Franco e Franco, 2003).

A biotransformação de agentes xenobióticos ocorre no interior das células, promovida por enzimas que modificam estas substâncias, geralmente lipossolúveis, em estruturas polares, solúveis em água e de fácil eliminação (Meyer, 1996). As reações de biotransformação ocorrem por meio de enzimas em vários tecidos do organismo (sangue, rins, pulmões, pele, tecido nervoso, intestino delgado e fígado), mas, é principalmente no fígado, que encontramos a maior expressão dessas enzimas (Watkins, 1992).

A maioria dos xenobióticos atinge o organismo através da via gastrointestinal e, neste sentido, o fígado é o principal órgão de biotransformação devido a sua posição, suprimento de sangue e função. As

enzimas envolvidas na biotransformação estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático liso e no citosol das células hepáticas, em número menor, estão presentes ainda nas mitocôndrias e em outras organelas (Oshima-Franco e Franco, 2003).

As enzimas citocromo P450 formam uma grande família de hemoproteínas envolvidas especialmente no metabolismo de substâncias químicas (agentes xenobióticos), como também na biossíntese de lipídeos, esteróides, vitaminas e outros metabólitos naturais das células (Chefson e Auclair, 2006), sendo essenciais para todo organismo vivo, tanto procarioto quanto eucarioto (Nebert e Gonzalez, 1987; Nebert *et al.*, 1989).

A família de genes do citocromo P450 diversificou-se desde sua origem, há mais 3,5 bilhões de anos, para adaptar-se ao metabolismo de um número crescente de substâncias químicas ambientais, toxinas alimentares e substâncias químicas ingeridas diariamente (Benet e Scheiner, 1987).

O componente primordial desse complexo enzimático é o citocromo P450, monoxigenase que apresenta um núcleo pirrólico com átomo de ferro, semelhante à hemoglobina, sendo, por esse motivo, considerada uma hemoproteína. Os outros componentes do sistema microsomal hepático são três flavoproteínas (NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-citocromo b5-redutase e N-oxidase), responsáveis pela transferência de elétrons, e outra hemoproteína, o citocromo b5 (Oga, 2003).

O sistema enzimático citocromo P450 pode ser isolado a partir de seqüências de homogeneização e ultracentrifugação de tecido hepático, que levam à fragmentação e re-selamento do retículo endoplasmático liso, em vesículas que mantêm suas características, denominadas microsomas. Enzimas desidrogenases, esterases, amidases e transferases são encontradas na fração solúvel (citoplasmática) e monoamino oxidases, na fração mitocondrial (Oshima-Franco e Franco, 2003).

Algumas substâncias são capazes de se ligar ao P450, como é o caso do estanozolol, derivado sintético de testosterona, que tem a propriedade de interagir com o citocromo P450 formando um complexo com alta afinidade de ligação (Rendic e Ruf, 1988), sendo que essa interação inibe a ação metabólica do citocromo P450 (Nakajin *et al.*, 1989).

As conseqüências da inibição correspondem à menor velocidade de biotransformação, aumento dos níveis do agente xenobiótico no organismo, aumento dos efeitos farmacológicos, e maior toxicidade da substância química (Benet e Scheiner, 1987).

Os agentes xenobióticos podem, na biotransformação, tanto ser inativados, quanto gerar metabólitos com atividade aumentada, ou com efeitos tóxicos, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (Oshima-Franco e Franco, 2003), como é o caso do uretano (URE – etilcarbamato), um agente genotóxico que tem sua ação potencializada pelo metabolismo do P450 (Frölich e Würgler, 1990; Graf e van Scheik, 1992; Abraham e Graf, 1996; Dogan *et al.*, 2005).

Alterações genéticas e a carcinogênese

No decorrer da vida, o material genético sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA. As mutações ocorrem em todo ser vivo, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas, na maioria dos casos, as mutações podem não ser percebidas, ou por não causarem modificações detectáveis na atividade metabólica, ou por determinar a morte celular. Desta forma, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode ser detectado, determinando assim, vantagens para o organismo ou então um crescimento desordenado de células (Ribeiro e Marques, 2003).

As alterações genéticas e a carcinogênese estão estreitamente associadas, porque ambas representam alterações em uma única célula, permanentes e herdáveis pelas células filhas. Por isso, os testes de mutagenicidade são recomendados para pré-seleção de agentes químicos a serem avaliados quanto ao seu potencial carcinogênico (Rabelo-Gay *et al.*, 1991).

Os agentes mutagênicos aceleram o aparecimento de mutações e estão relacionados ao aparecimento das neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula pode acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar o aparecimento do câncer (Ribeiro e Marques, 2003).

Os tumores surgem através de um processo de múltiplas etapas no qual ocorrem as mutações herdadas (derivadas de células germinativas) e mutações somáticas de genes celulares, seguidas de uma seleção clonal da progênie variante com propriedades de crescimento mais robustas e agressivas. A grande maioria das mutações que contribuem para o desenvolvimento e comportamento das células tumorais são mutações somáticas que surgem durante o desenvolvimento do tumor e estão presentes apenas nas células neoplásicas do paciente. Uma pequena fração de todas as mutações que ocorrem no câncer pode ser constitucional, estando, dessa forma, presentes em todas as células somáticas dos indivíduos afetados; tais mutações podem não apenas predispor o indivíduo ao câncer, como também ser passadas para as gerações futuras (Ojopi e Dias Neto, 2002).

As causas de um tumor são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, inter-relacionadas. As causas exógenas relacionam-se ao ambiente, são agentes normalmente presentes no meio (luz solar, radiações ionizantes ou agentes químicos) e aos hábitos ou costumes sócio-culturais associados ao estilo de vida e qualidade da dieta, enquanto, as causas endógenas, são geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo se defender das agressões externas ou a pré-disposição ao desenvolvimento da neoplasia. Esses fatores podem se interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (Setlow, 2001; Ribeiro e Marques, 2003).

A maioria das alterações genéticas mais importantes no câncer ocorrem nos genes que controlam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores tumorais), resultando em um crescimento descontrolado característico da célula maligna. Além disso, há ainda o envolvimento de genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem elevar a taxa de mutação das células, causando,

eventualmente, a alteração de genes importantes na carcinogênese (Ojopi e Dias Neto, 2002).

A genética toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e eventos aneuploidogênicos. Ainda que a alta correlação entre estas lesões e o desenvolvimento do processo carcinogênico seja um fato iquestionável, permanecem as considerações sobre a existência de carcinógenos destituídos de atividade mutagênica, seja ela gênica ou cromossômica (Richard, 1994 *apud* Andrade e Lehmann, 2003).

Novos sistemas de testes foram desenvolvidos para a detecção de um parâmetro especial de alteração genética, a recombinação mitótica. Alguns agentes recombinogênicos podem estar envolvidos diretamente com a carcinogênese (Andrade e Lehmann, 2003).

O principal argumento que reforça a participação da recombinação entre homólogos como um dos fatores preponderantes no processo carcinogênico é a demonstração de que a recombinação homóloga é o mecanismo que mais contribui para a perda da heterozigose em células somáticas (Bishop e Schiestl, 2000 *apud* Andrade e Lehmann, 2003).

A perda da heterozigose pode levar à expressão de genes mutantes, antes mascarados pelo alelo selvagem (Gusmán-Rincón e Graf, 1995). Assim sendo, as recombinações somáticas apresentam um papel iniciador na carcinogênese envolvidas em etapas secundárias e subseqüentes, onde mutações oncogênicas recessivas são reveladas (Bishop e Schiestl, 2002).

Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste para detecção de mutação e recombinação somática ("Somatic Mutation And Recombination Test" - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984), sendo considerado um teste rápido, barato e que produz resultados confiáveis, inequívocos e altamente reproduzíveis. A *D. melanogaster* apresenta, ainda, as vantagens de ter um curto período de geração, o que possibilita a rapidez do teste; um

pequeno número de cromossomos; linhagens muito bem caracterizadas geneticamente; e um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos (Baars, 1980 *apud* Graf *et al.*, 1984).

Este teste detecta a perda da heterozigose, que pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por agentes físicos e químicos, em células primordiais dos discos imaginais de asas, no período de larva.

No SMART de asa são utilizadas as linhagens de *D. melanogaster* "multiple wing hairs" (mwh), flare³ (flr³) e "Oregon R, flare³" (ORR; flr³). A linhagem "mwh" (com constituição genética *y; mwh jv*) possui o marcador *mwh* que se localiza no cromossomo 3 (3-3,0) e que tem sua manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais pêlos por célula da asa. A linhagem "flr³" (de constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) possui o marcador *flr³*, também no cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8) e sua manifestação fenotípica é caracterizada por um pêlo modificado em forma de chama. O marcador *flr³* em homozigose é letal, ou seja, zigotos homozigotos para o *flr³* não conseguem se desenvolver até a fase adulta (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Para isso, foi desenvolvido um cromossomo balanceador *TM3, Bd^S* (*Third Multiple 3, beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem. A presença deste balanceador impede que haja recombinação, ou seja, a troca de material genético entre cromossomos homólogos, devido à presença de múltiplas inversões neste cromossomo (Lindsley e Zimm, 1992 *apud* Graf *et al.*, 1996).

Na linhagem "ORR; flr³" (de constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) o marcador *flr³* também encontra-se presente. No entanto, esta linhagem difere da linhagem "flare³" por apresentar uma alta atividade das enzimas citocromo P450 (Hällström e Blanck, 1985 *apud* Graf e van Shaik, 1992), as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de promutágenos e procarcinógenos (Dapkus e Marell, 1977 *apud* Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Os cromossomos 1 e 2 são provenientes da linhagem Oregon R, resistente ao DDT, construída por Frölich e Würigler (1989).

No teste para detecção de mutação e recombinação somática, em células de asas de *D. melanogaster*, são utilizados machos "mwh" ($mwh + / mwh +$) cruzados com fêmeas virgens das linhagens "flr³" ($+ flr^3 / + TM3, Bd^S$) - cruzamento padrão (ST) - e "ORR; flr³" ($ORR / ORR; + flr^3 / + TM3, Bd^S$) - cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB). Ambos cruzamentos produzem indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH), com constituição genotípica $mwh + / + flr^3$; e indivíduos heterozigotos balanceados (BH), constituídos por $mwh + / + TM3 Bd^S$ (**Figura 1.4**), que podem ser facilmente identificados pelo aspecto fenotípico das asas (**Figura 1.5**).

A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais. A análise dos indivíduos BH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas. No entanto, devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis. A célula que sofreu perda do alelo selvagem irá desenvolver o fenótipo mutante, durante a metamorfose no estágio de pupa, e pode ser diferenciada facilmente das demais (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Na **Figura 1.6** estão representados cromossomos de células primordiais dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica normal (adaptado de Graf *et al.*, 1984).

As **Figuras 1.7** e **1.8** mostram os diferentes mecanismos genéticos (deleção, mutação de ponto, e recombinação) responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes em asas de *D. melanogaster* (adaptado de Graf *et al.*, 1984).

A **Figura 1.9** mostra fotografias de asas de *D. melanogaster*, ao microscópio óptico de luz (aumento 400x), com manchas mutantes simples ("mwh") e gêmeas ("mwh" e "flr").

O Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) vem se mostrando eficiente na avaliação de efeitos genotóxicos e antigenotóxicos para uma grande diversidade de compostos, como mostram os trabalhos produzidos pelo Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da

Universidade federal de Uberlândia (Valadares *et al.*, [in press]; Fragiorge *et al.*, [in press]; Silva *et al.*, [in press]; Fragiorge *et al.*, 2007; Pantaleão *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2006).

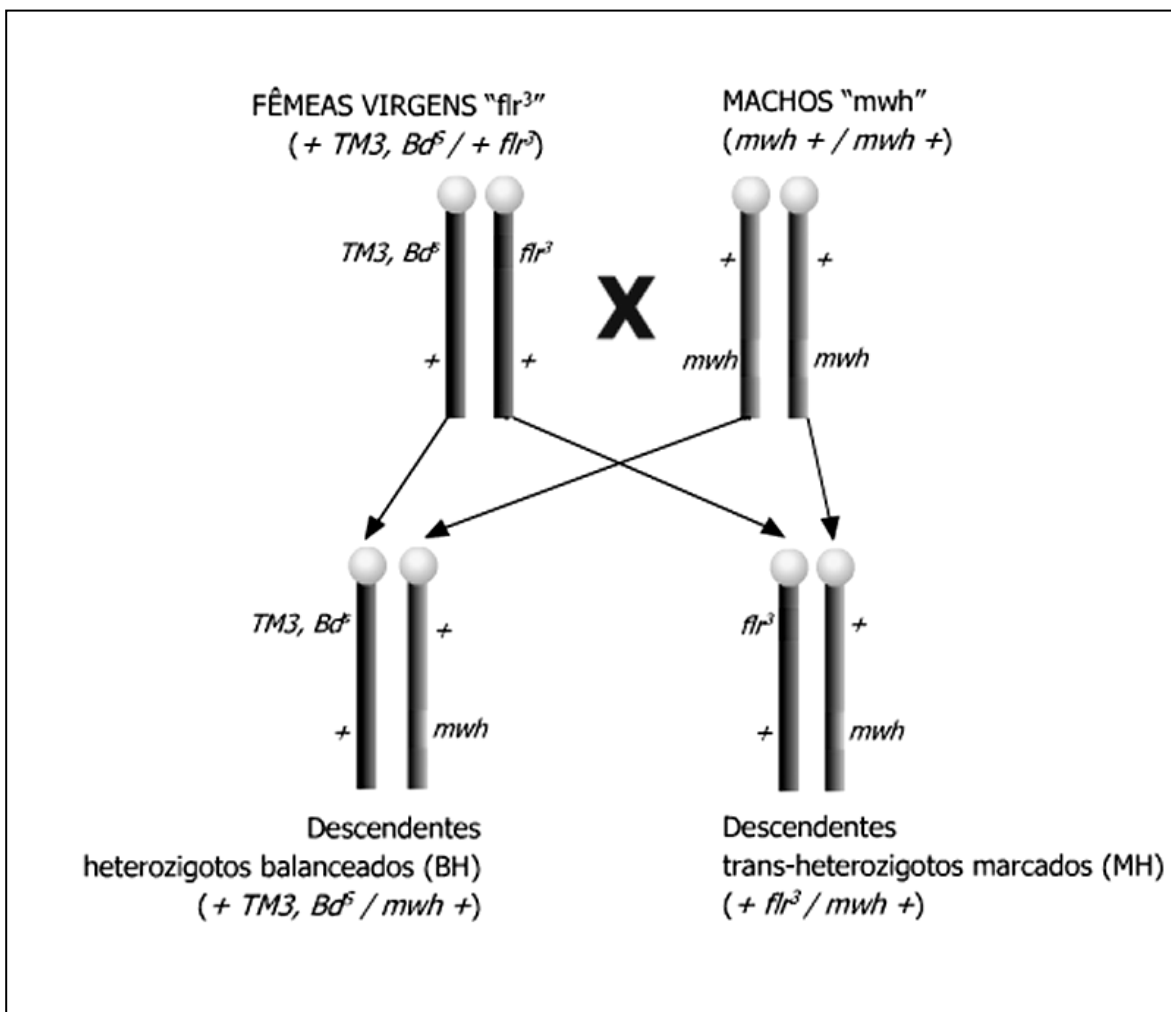


Figura 1.4 – Representação esquemática do cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens da linhagem "flr³" (+*TM3*,*Bd^S*/+*flr³*) são cruzadas com machos "mwh" (*mwh* + / *mwh* +), originando descendentes trans-heterozigotos marcados – MH (+*flr³*/*mwh*+) e descendentes heterozigotos balanceados – BH (+*TM3*,*Bd^S*/*mwh*+).

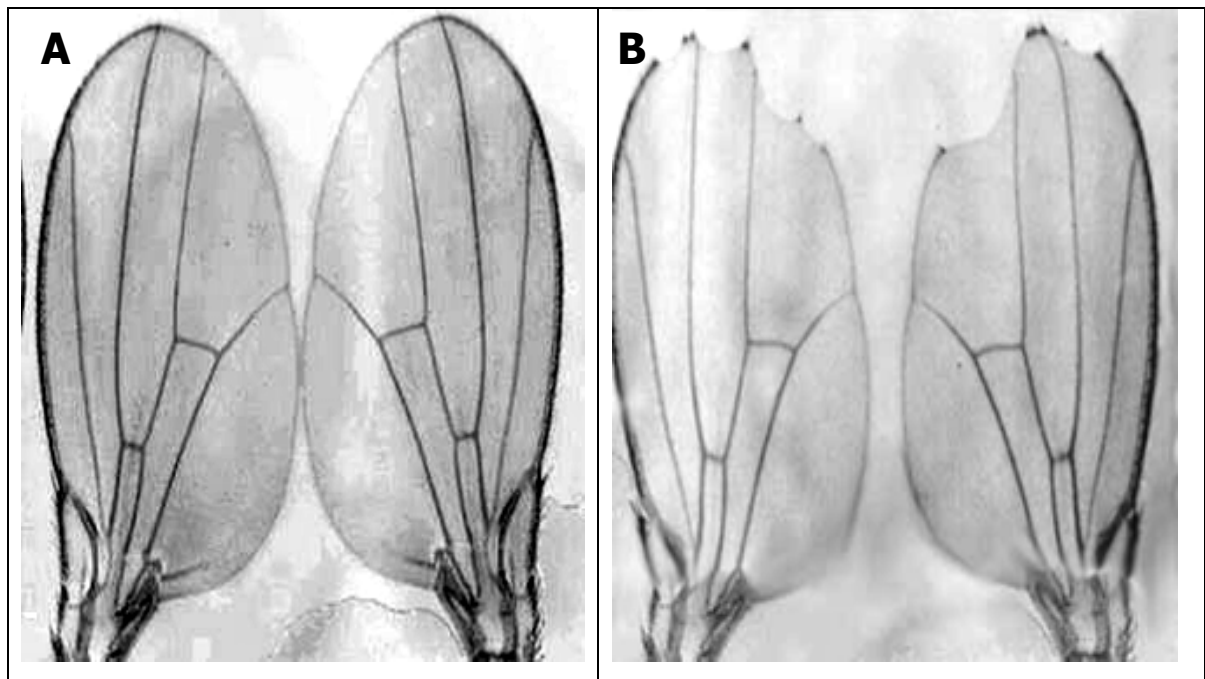


Figura 1.5 – Pares de asas de *D. melanogaster*. **A** – Asas com bordas lisas; característica dos indivíduos da linhagem “mwh”, herdada pelos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH); **B** – Asas com bordas recortadas (*serrate*); característica dos indivíduos das linhagens “flr³” e “ORR; flr³”, herdada pelos descendentes heterozigotos balanceados (BH).

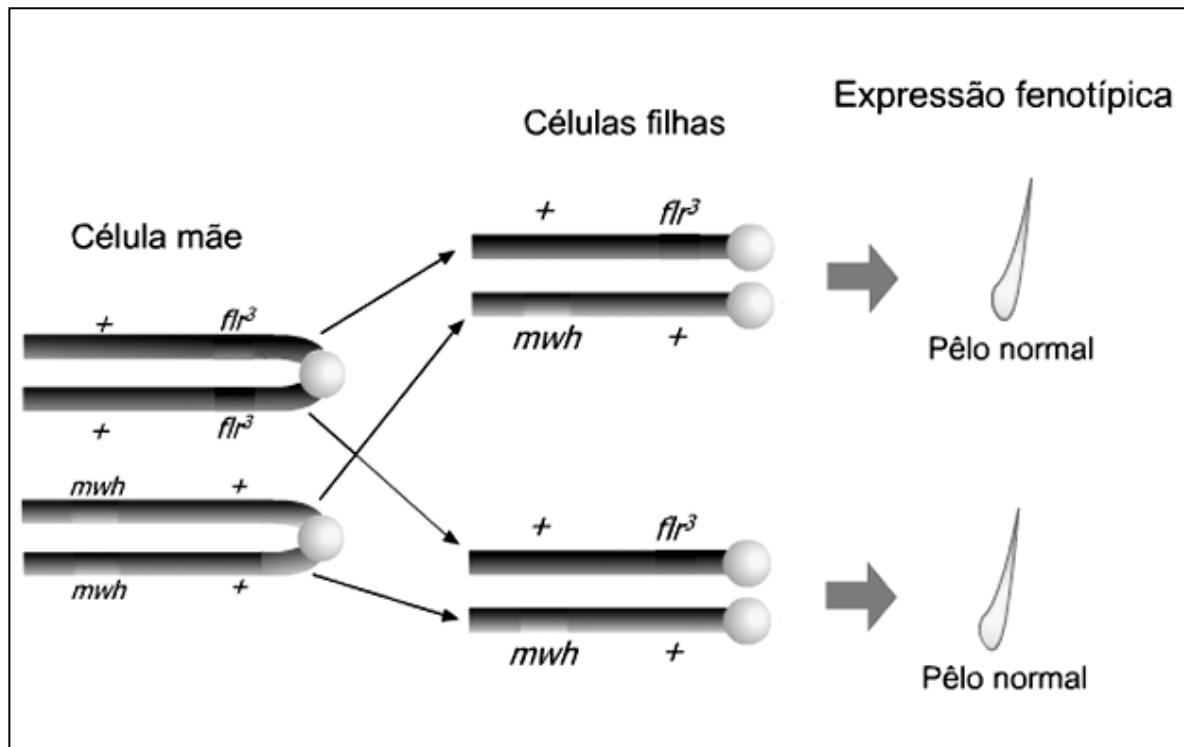


Figura 1.6 – Representação esquemática de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica normal (adaptado de Graf *et al.*, 1984).

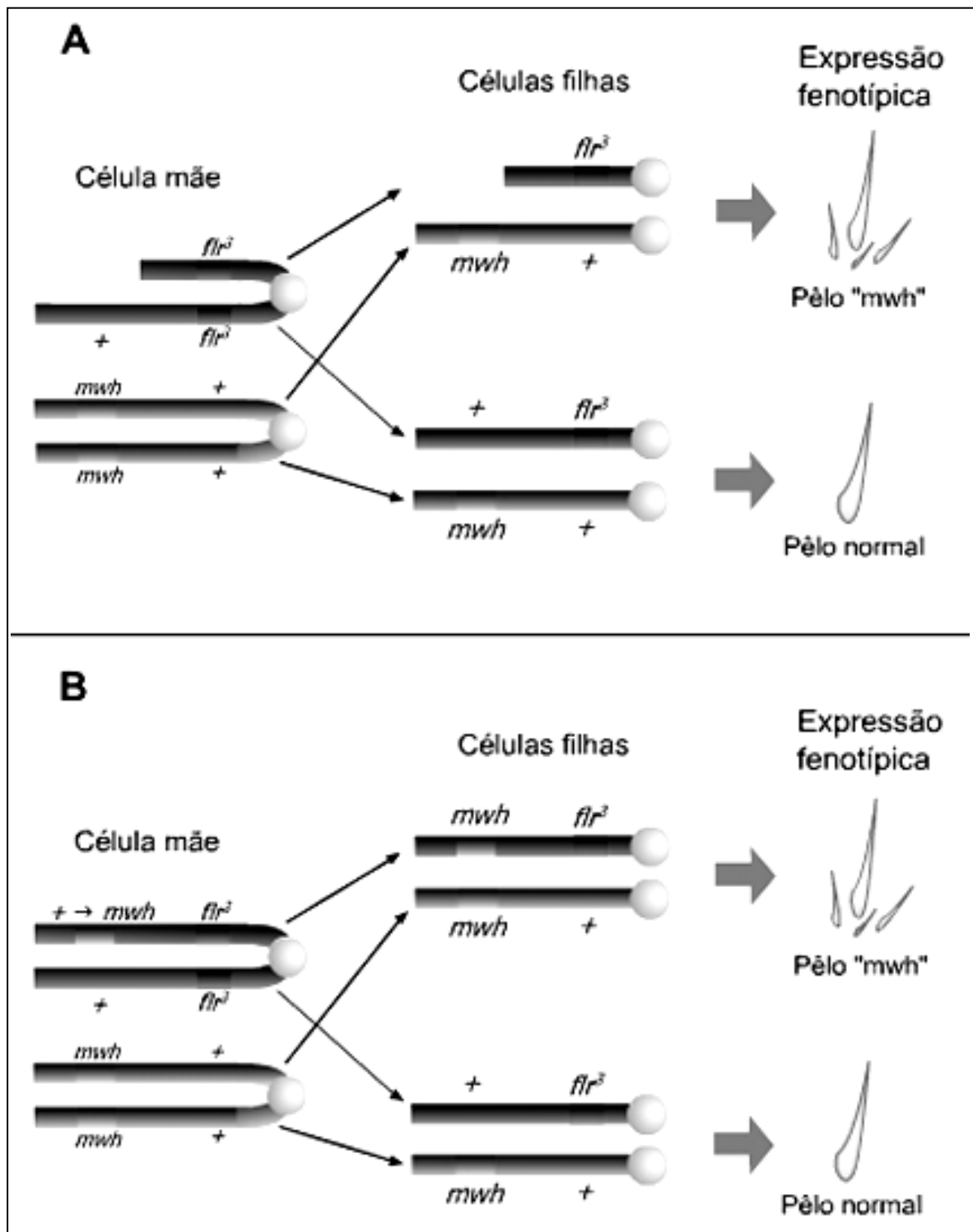


Figura 1.7 – Representações esquemáticas de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica, com ocorrência de deleção (**A**), e de mutação de ponto (**B**) levando à formação de manchas mutantes simples do tipo “mwh” (adaptado de Graf *et al.*, 1984).

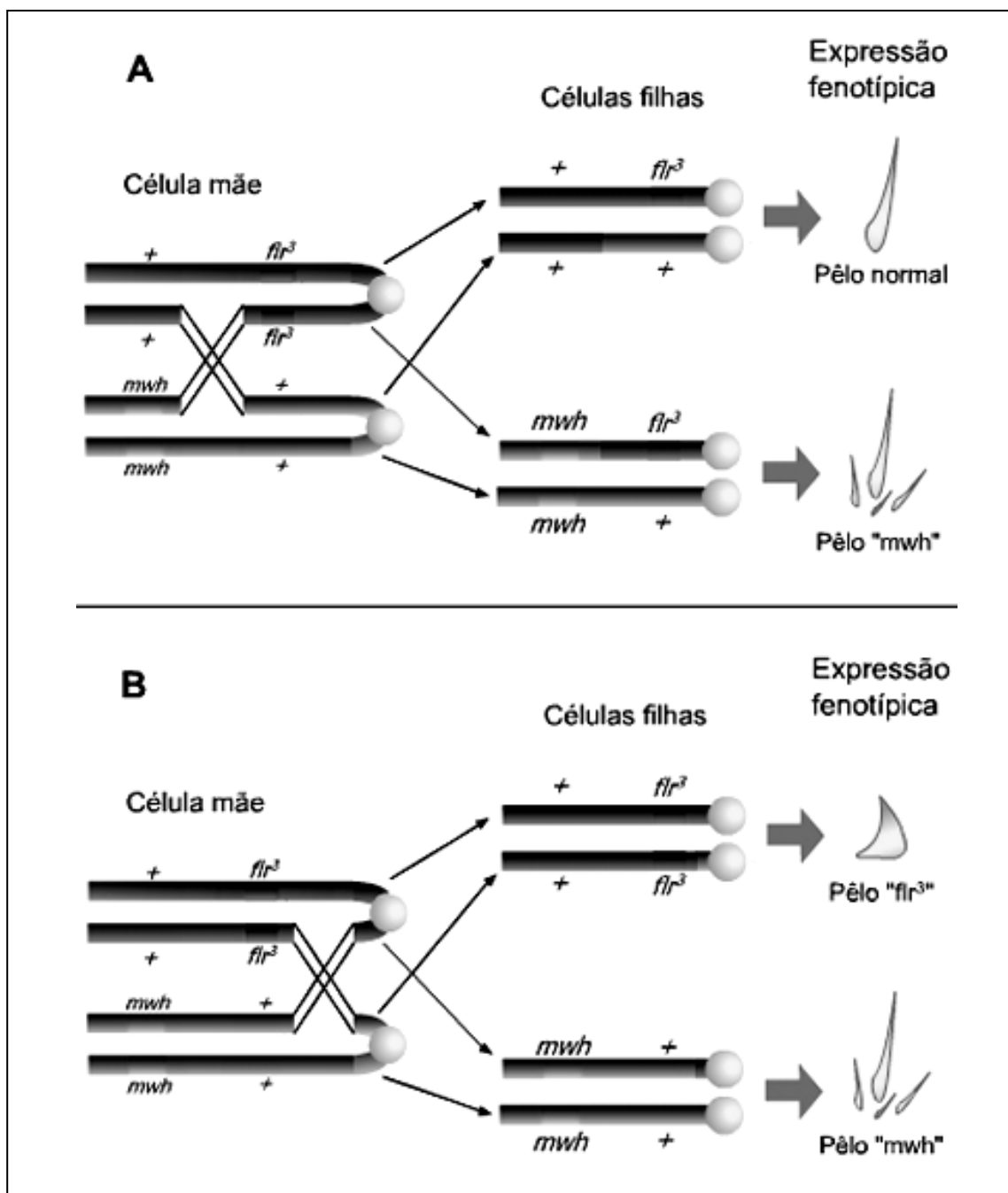


Figura 1.8 – Representações esquemáticas de cromossomos de células dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica, com ocorrência de recombinação entre os loci *flr³* e *mwh* (A), com formação de mancha simples; e recombinação entre o centrômero e o locus *flr³* (B), com a conseqüente formação de mancha gêmea (adaptado de Graf et al., 1984).

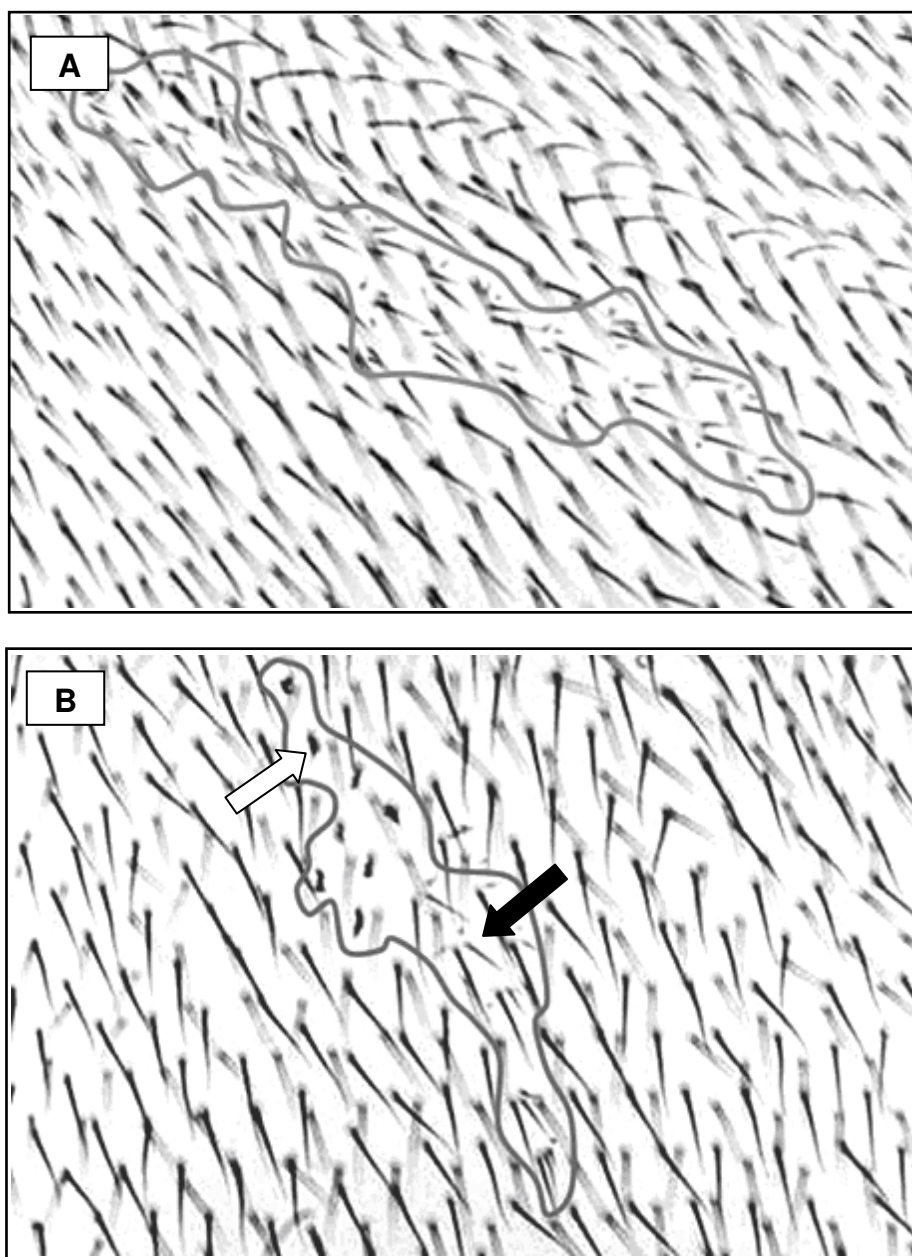


Figura 1.9 – Fotografias de pêlos de asa de *D. melanogaster*, ao microscópio óptico de luz (aumento de 400x), mostrando: **A** - mancha simples (contornada pela linha) com pêlos múltiplos (“mwh”) e **B** - mancha gêmea (contornada pela linha) com pêlos em forma de chama (“flr³”), indicados pela seta branca; e pêlos múltiplos (“mwh”), indicados pela seta preta.

Referências Bibliográficas

Abraham SK, Graf U. 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. Food Chem Toxicol 34:1-14.

Ahmad ME, Shadab GG, Azfer MA. 2003. Effect of oxymetholone on SCE frequency in human lymphocyte chromosomes in vitro. Teratog Carcinog Mutagen. Suppl 1, 267-272.

Andrade HHR, Lehmann M. 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese Ambiental, Canoas: Ed. ULBRA, 281-307.

Anthony PP. 1988. Liver tumours. Baillieres Clin Gastroenterol, 2(2), 501-522.

Araújo LR, Andreolo J, Silva MS. 2002. Utilização de suplemento alimentar e anabolizantes por praticantes de musculação nas academias de Goiânia (GO). Rev Bras Ciên e Mov, 10(3), 13-18.

Assunção SSM. 2002. Dismorfia muscular. Rev Bras Psiquiatr, 24(supl III), 80-84.

Benet LZ, Sheiner LB. 1987. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F (org). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 7.^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1195p.

Bishop AJR, Schiestl RH. 2002. Homologous recombination and its role in carcinogenesis. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2, 75-85.

Bosland MC. 2006. Sex steroids and prostate carcinogenesis: integrated, multifactorial working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1089, 168-176.

Cairolí CED. 2004. Deficiência androgênica no envelhecimento masculino (DAEM). *Rev AMRIGS*, 48(4), 291-299.

Carrasco D, Prieto M, Pallardó L, Moll JL, Cruz JM, Berenguer J. 1985. Multiple hepatic adenomas after long-term therapy with testosterone ananthate – Review of the literature. *J Hepatol*, 1(6), 573-578.

Carreira Filho D, Martins Filho J. 2005. Prevalência do uso de substâncias químicas entre adolescentes, com finalidade de modelagem corporal. *Rev Bras Ciênc Esporte*, 27(1), 93-111.

Chefson A, Aocalir K. 2006. Progress toward the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst*, 2, 462-469.

Costa M. 1993. Sexo: o dilema do homem – força e fragilidade. 2ª ed. São Paulo: Gente, 211 p.

Costa RP. 1994. Os onze sexos – as múltiplas facetas da sexualidade humana. São Paulo: Gente, 207p.

Coutrine JJ. 1995. Os Stakhanovistas do narcisismo: body-building e puritanismo ostentatório na cultura americana. *In*: Santana DB (org), Políticas do corpo, São Paulo: Estação Liberdade, 39-48.

Dal Pizzol Tda S; Branco MM; Carvalho RM; Pasqualotti A; Maciel EN; Migott AM. 2006. Uso não-médico de medicamentos psicoativos entre escolares do ensino fundamental e médio no Sul do Brasil. *Cad Saúde Pública*, 22(1), 109-115.

De Micheli D, Formigoni ML. 2004. Drug use by Brazilian students: associations with family, psychosocial, health, demographic and behavioral characteristics. *Addiction*, 99(5), 570-578.

Dogan EE, Yesilada E, Ozata L, Yologlu S. 2005. Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. *Drug Chem Toxicol* 28:289-301.

Durant RH, Rickert VI, Ashworth CS, Newman C, Slavens G. 1993. Use of multiple drugs among adolescents who use anabolic steroids. *NEJM*, 328, 922-926.

Fragiorge EJ, Rezende AAA, Graf U, Spanó MA. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* (*in press*).

Fragiorge EJ, Spanó MA, Antunes LMG. 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 30 (2): 449-455.

Froehner M, Fischer R, Leike S, Hakenberg OW, Noack B, Wirth MP. 1999. Intratesticular leiomyosarcoma in a young man after high dose doping with Oral-Turinabol: a case report. *Cancer*, 86(8), 1571-1575.

Frölich A, Würigler FE. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 216, 179-187.

Frölich A, Würigler FE. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244:201-208.

Gaiarsa, JÁ. 1986. O corpo do homem. *In: Costa RP et al. Macho, masculine, homem: a sexualidade, o machismo e a crise de identidade do homem brasileiro.* 5ª ed, São Paulo: L&PM Editores, 39-43.

Giannitrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'Alessandro N, Montalto G. 2006. Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann N Y Acad Sci*, 1089, 228-236.

Goldenberg M. 2005. Dominação masculina e saúde: usos do corpo em jovens das camadas médias urbanas. *Cien Saúde Colet*, 10(1), 91-96.

Gorayski PM, Thomas AC, Thompson CH, Subhash HS. 2007. Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use. *Br J Sports Med*, [Epub ahead of print], Disponível *on-line*: <http://bjsm.bmj.com/cgi/rapidpdf/bjsm.2007.039321v2>. Acesso em 28 jul 2007.

Graf U, Spanó MA, Gusmán-Rincón J, Abraham SK, Andrade HHR. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newslett on Occup Health and Safety*, 6(1), 9-13.

Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 6, 153-188.

Gromatzky C. 2000. Disfunção erétil de etiologia orgânica – aspectos terapêuticos. *In: Abdo CHN (org). Sexualidade Humana e seus transtornos.* 2ª ed, São Paulo: Lemos Editorial, 238p.

Gusmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM *et al.* (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. New York: Plenum Press, 169-181.

Hite S. 1991. O relatório Hite sobre a sexualidade masculina. 4ª ed, Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1305p.

Holden HE, Stoll RE, Blanchard KT. 1999. Oxymetholone: II. Evaluation in the Tg-AC transgenic mouse model for detection of carcinogens. Toxicol Pathol. 27(5), 507-512.

Huenerbein A, Sípoli-Marques M, Pereira AS, Aquino-Neto FR. 2003. Improvement in steroid screening for doping control with special emphasis on stanozolol. J Chromatogr, 985, 375-386.

Iñigo MÁ, Arrimadas E, Arroya D. 2000. Estudio de 43 ciclos de tratamiento con anabolizantes esteroideos en deportistas: usos y efectos secundarios. Rev Clín Esp, 200(3), 133-138.

Iriart JAB, Andrade TM. 2002. Body-building, steroid use, and risk perception among young body-building from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil. Cad Saúde Pública, 18(5), 1379-1387.

Katzung BG. 2006. Farmacologia Básica & Clínica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1008p.

Kibble MW, Ross MB. 1987. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. Clinical Pharmaceutical, 6(9), 686-692.

Kimtz P, Cirimele V, Sachs H, Jeaneau T, Ludes B. 1999. Testing for anabolic steroids in hair from two bodybuilders. Forensic Sci Int, 101, 209-216.

Lang R, Redmann U. 1979. Non-mutagenicity of some sex hormones in the ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test. *Mutat Res*, 67, 361-365.

Lang R, Reimann R. 1993. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames *Salmonella*/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environ Mol Mutag*, 21, 272-304.

Lima DR. 2004. Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia. Rio de Janeiro: Medsi, 2215p.

Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros T. 1999. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Ver Ass med Brasil*, 45(4), 364-370.

Lowen A. 1988. Amor e orgasmo. 3ª ed, São Paulo: Sumus, 310p.

Lucas ACS, Parente RCP, Picanço NS, Conceição DA, Costa KRC, Magalhães IRS, Siqueira JCA. 2006. Uso de psicotrópicos entre universitários da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 22(3), 663-671.

Maciel-Guerra AT, Guerra Junior G. 2002. Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. Barueri: Manole, 327p.

McCarty B. 1981. O que você (ainda) não sabe sobre a sexualidade masculina. 3ª ed, São Paulo: Summus, 234p.

Manetta MCP, Silveira DX. 2000. Uso abusivo de esteróides anabolizantes androgênicos. *Psiquiatria na Prática Médica*, 33(4). Disponível *on-line*: http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/atu1_04.htm. Acesso em 20 jul 2007.

Meyer U. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. J Pharmacokinet Biopharm, 24, 449-459.

Molle ACM, Matheus ICN, Lucena JR, Nunes L, Oliveira LS, Sholl-Franco S. 2004. Fatores psicológicos na terapia hormonal em homens. Ciênc Cogn, 03, 4-9.

Morales A, Buvat J, Gooren LJ, Guay AT, Kaufman JM, Tan HM, Torres LO. 2004. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. J Sex Med, 1(1), 69-81.

Mottran DR, George AJ. 2000. Anabolic steroids. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 14(1), 55-69.

Muniz M, Affonso R, Costa VR. 1997. Musculatura de risco: uso indiscriminado de anabolizantes prejudica a saúde de jovens. Ciência Hoje, 22(131), 18-23.

Nakajin S, Takahashi K, Shinoda M. 1989. Inhibitory effect and interaction of stanozolol with pig testicular cytochrome P-450 (17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase). Chem Pharm Bull 37:1855-1858.

Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. P450 genes, structure, evolution and regulation. Ann Rev Biochem, 56, 945-993.

Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. Xenobiotica, 19, 1149-1160.

Neves CN, Souza MOT, Pereira RVA. 2005. Esteróides anabolizantes: implicações sociofisiológicas em academias. Rio de Janeiro: Colina Ed., 102p.

NIDA (National Institute on Drug Abuse). 2007. Research Report Series: anabolic steroids abuse. Disponível em: http://www.drugabuse.gov/NIDA_Notes/. Acesso em: 02 set 2007.

Nilson S. 1995. Androgenic anabolic steroid use among male adolescents in Falkenberg. *Eur J Clin Pharmacol*, 48, 9-11.

Oga S. 2003. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 472p.

Ojopi EPB, Dias Neto E. 2002. Genes e Câncer: alguns eventos moleculares envolvidos na formação de um tumor. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 27, 28-38.

Oshima-Franco Y, Franco LM. 2003. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde Rev*, 5(9), 69-76.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Pavanin LA, Graf U, Rezende AAA, Valadares BLB, Fragiorgio EJ, Souza NC, Guterres ZR, Spanó MA. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 48 (2): 96-105.

Perry HM, Wright D, Littlepage BN. 1992. Dying to the big: a review of anabolic steroid use. *Br J Sports Med*, 26, 259-261.

Pope HG, Phillips KA, Olivardia R. 1999. *O Complexo de Adônis: obsessão masculina pelo corpo*. São Paulo: Campus, 320p.

Rabello-Gay MA, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. 1991. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética / Revista Brasileira de Genética, 241p.

Reimann R, Kalweit S, Lang R. 1996. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex hormones. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. *Environ Mol Mutagen*, 28, 133-144.

Rendic S, Ruf HH. 1988. Interaction of stanozolol with cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*, 37(4), 766-768.

Ribeiro LR, Marques EK. 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *In*: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*, Canoas: Ed. ULBRA, 21-27.

Ricke WA, Ishii K, Ricke EA, Simko J, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR. 2006. Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis, *Int J Cancer*, 118(9), 2123-2131.

Rodrigues Jr OM. 1995. Identidade masculina: paradoxos na sexualidade. *Rev Bras Sex Humana*, 7(1), 84-93.

Sanofi-Synthelabo. 1999. Prescribing information (Winstrol®, stanozolol). Disponível *on-line*: http://www.sanofisynthelabous.com/products/pi_winstrol/pi_winstrol.html. Acesso em: 26 mar 2003.

Santos BF. 2000. A medida do homem – tudo o que você precisa saber para ter o pênis maior (ou menor), Porto Alegre: Impr. Livre, 175 p.

Santos AM. 2003. O mundo anabólico: análise do uso de esteróides anabólicos no esporte. Barueri: Manole, 275p.

Santos AF, Mendonça PMH, Santos LA, Silva NF, Tavares JKL. 2006. Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE). *Psicol Estudo*, 11(2), 371-380.

Santos BS. 1997. Pela mão de Alice: o social e o político na pós-modernidade. São Paulo: Cortez, 348p.

Scott DM, Wagner CJ, Barlow TW. 1996. Anabolic steroid use among adolescents in Nebraska schools. *Am J Health Syst Pharm*, 53, 2068-2072.

Setlow RB. 2001. Human cancer: etiologic agents/dose-response/DNA repair/cellular and animal models. *Mutat Res*, 477, 1-6.

Silva LP, Costa-Cruz JM, Spano MA, Graf U. 2006. Genotoxicity of vesicular fluid and saline extract of *Taenia solium* metacestodes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47 (4): 247-253.

Silva LSMF, Moreau RLM. 2003. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev Bras Ciênc Farm*, 39(3), 327-333.

Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. 2002. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte*, 8(6), 235-243.

Silva, P. 2006. *Farmacologia*. 7^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1398p.

Silva RMG, Sousa NC, Graf U, Spanó MA. Antigenotoxic Effects of Crude Extract from *Mandevilla velutina* (Mart. Ex Stadelm.) Woodson (Apocinaceae) on Cyclophosphamide-Induced Micronuclei in Mice and Urethane-Induced Somatic Mutation and Recombination in *Drosophila melanogaster*. *Gen Mol Biol* (*in press*).

Socas L, Zumbado M, Pérez-Luzardo O, Ramos A, Pérez C, Hernández JR, Boada LD. 2005. Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br J Sports Med*, 39(5). Disponível *on-line*: <http://bjsm.bmj.com/cgi/reprint/39/5/e27>. Acesso em 27 jul 2007.

Souza ES, Fisberg M. 2002. Uso de esteróides anabolizantes na adolescência. *Brazil Ped News*, 4(1). Disponível *on-line*:

<http://www.brazilpednews.org.br/mar2002/bnp3302.pdf>. Acesso em: 27 mar 2005.

Taylor W. 1987. Risk factors associated with the use of sex hormones. *Anticancer Res*, 7(5B), 943-948.

Tricker R, O'Neill MR, Cook D. 1989. The incidence of anabolic steroids use among competitive bodybuilders. *J Drug Educ*, 19(4), 313-325.

Valadares BLV. 2001. O homem e o pênis: a sexualidade masculina sob o ponto de vista do próprio homem. Monografia de Especialização em Orientação Sexual, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.

Valadares BLB, Graf U, Spanó MA. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* (*in press*).

Watkins PB. 1992. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterology Clin North Am*, 21, 511-526.

Yesalis CE, Barsukiewicz CK, Kopstein AN, Bahrke MS. 1997. Trends in anabolic-androgenic steroid use among adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 151(12), 1197-1206.

Yesalis CE, Kennedy JC, Kopsteinr NA, Bahrke MS. 1993. Anabolic-androgenic steroid use in the United States. *JAMA*, 270, 1217-1221.

CAPÍTULO II

**Avaliação genotóxica de esteróides androgênicos anabólicos (EAA)
sintéticos derivados da testosterona em células somáticas de *Drosophila*
*melanogaster***

Avaliação genotóxica de esteróides androgênicos anabólicos (EAA) sintéticos derivados da testosterona em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Bruno Lassmar Bueno Valadares e Mário Antônio Spanó

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia (MG) Brasil

Running title: Avaliação genotóxica de derivados da testosterona

Autor para correspondência: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese, Bloco D – sala 2D52, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia (MG) Brasil.
Tel. +55 34 3218 2505.
E-mail: maspano@ufu.br

Fontes de financiamento:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Universidade Federal de Uberlândia

Palavras chave: Hemogenin, deca durabolin, durateston, Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART.

Resumo

Os esteróides androgênicos anabólicos (EAA) sintéticos derivados da testosterona, empregados na medicina humana com fins terapêuticos, são utilizados de forma indiscriminada, por atletas e fisiculturistas, com o objetivo de ganhar maior força e massa muscular, apesar de pouco se conhecer sobre seus efeitos colaterais. Hemogenin® (HEM) (oximetolona); Deca Durabolin® (DEC) (decanoato de nandrolona); e Durateston® (DUR) (associação de propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona), encontram-se entre os EAA mais utilizados para tais fins. Este trabalho teve como objetivo avaliar comparativamente os possíveis efeitos genotóxicos de diferentes EAA sintéticos derivados da testosterona. Para tanto, foi empregado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Larvas de terceiro estágio, descendentes dos cruzamentos padrão (ST) (fêmeas *flr3* / TM^3 , Bd^S cruzadas com machos *mwh*) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) (fêmeas *ORR*; *flr3* / TM^3 , Bd^S cruzadas com machos *mwh*) foram tratadas com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) de HEM diluído em água destilada estéril; com DEC (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) e DUR (0,195; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125 mg/mL), isoladamente, diluídos em 1% Tween-80 + 3% etanol em água. Como controle positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, o pró-mutágeno uretano (URE) 0,891 mg/mL, e os solventes utilizados nas diluições dessas substâncias. As freqüências de manchas mutantes observadas nos grupos tratados com as diferentes concentrações de EAA, em ambos cruzamentos (ST e HB), foram estatisticamente não significativas quando comparadas com os controles negativos. Estes resultados nos permitem concluir que, nessas condições experimentais, os EAA HEM, DEC e DUR não possuem efeitos genotóxicos em células de asas de *D. melanogaster*.

Key words: Hemogenin, deca durabolin, durateston, Somatic Mutation and Recombination Test – SMART.

Abstract

Anabolic steroids are synthetic derivatives of testosterone modified to enhance the anabolic rather than the androgenic actions of the hormone. There are numerous side-effects to anabolic steroids, including carcinogenesis. Hemogenin® (HEM) (oximetholone); Deca Durabolin® (DEC) (decanoate of nandrolon); and Durateston® (DUR) (propionate of testosterone, fenilppropionate of testosterone, isocaproate of testosterone and decanoate of testosterone) are listed as the more used steroids. This study evaluated the genotoxic effects of derivatives of testosterone compounds presents in three drugs by means of the wing spot test of *D. melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART). Third-instar larvae derived from standard cross (ST), where *flr3 / In(3LR) TM3, ri p^psep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females were mated with *mwh* males, and high bioactivation cross (HB), where *ORR; flr3 / In(3LR) TM3, ri p^psep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females were mated with *mwh* males, were treated for approximately 48 h with different concentrations of HEM (0.625; 1.25 e 2.5 mg/mL) in water; DEC (0.15625; 0.3125; 0.625; 1.25 e 2.5 mg/mL) and DUR (0.195; 0.39; 0.78; 1.56 e 3.125 mg/mL), in solution of 1% Tween-80 + 3% ethanol in water; like positive control was used urethane (URE 0.891 mg/mL), and negative, the respective solvents used. The results obtained with the two different crosses were rather similar, and three drugs showed non-mutagenic effects in *D. melanogaster* somatic cells.

Introdução

Os esteróides androgênicos anabólicos (EAA) sintéticos derivados da testosterona são compostos químicos modificados para aumentar a ação anabólica (síntese protéica), em relação aos efeitos androgênicos (acentuação dos caracteres sexuais masculinos secundários) deste hormônio (Muniz *et al.*, 1997; Kintz *et al.*, 1999; Mottram e George, 2000; Santos, 2003; Neves *et al.*, 2005).

A testosterona e seus derivados sintéticos EAA, são utilizados para fins terapêuticos de reposição hormonal em indivíduos no período de climatério masculino (andropausa), com sinais e sintomas de diminuição da libido, decréscimo na atividade mental e física e impotência por razão endócrina; em casos de distúrbios hipogonadais, castração, eunucoidismo e hipopituitarismo; tratamento de osteoporose com origem na deficiência de andrógenos e para tipos diversos de anemias (Comhaire, 2000; Bonaccorsi, 2001; Rangel *et al.*, 2002; Cairoli, 2004; Lima, 2004; Dourado e Godoy, 2004; Morales *et al.*, 2004). São utilizados por atletas para obtenção, à curto prazo, de melhores resultados em ganho de massa muscular (Lise *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2002; Iriart e Andrade 2002; Silva *et al.*, 2002; Jazayeri e Amani, 2004; Santos *et al.*, 2006; Aquiló-Calatayud *et al.*, 2007), sendo relatado, ainda, o uso por adolescentes e jovens universitários de ambos os sexos (Yesalis *et al.*, 1997; Bahrke *et al.*, 1998; Faigenbaum *et al.*, 1998; Neilor *et al.*, 2001; Kindlundh *et al.*, 2001; Labre, 2002; Souza e Fisberg, 2002; De Micheli e Formigoni, 2004; Dal Pizzol *et al.*, 2006; Pallesen *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2006 Dal Pizzol *et al.*, 2006; Pallesen *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2006; Elliot *et al.*, 2007; Wanjek B *et al.*, 2007; vandenBerg *et al.*, 2007). Comumente, é encontrada a utilização de diferentes EAA administrados simultaneamente de forma indiscriminada ou em períodos denominados “ciclos”, com doses exacerbadamente maiores que as determinadas em tratamentos clínicos (Pope e Katz, 1988; Iñigo *et al.*, 2000; Manetta e Silveira, 2000).

Efeitos adversos causados pelo uso de EAA são freqüentes e, alguns deles, irreversíveis, o que se contrapõe aos benefícios estéticos e fisiológicos advindos da utilização destas substâncias (Kimbble e Ross, 1987; Evans, 1997;

Korkia e Stimson, 1997; Rich *et al.*, 1999; Iñigo *et al.*, 2000; Hartgens e Kuipers, 2004). Vários estudos relatam os danos à saúde, causados pelo seu uso, tais como hipertensão arterial e problemas cardíacos (Clark e Schofiels, 2005; Kindermann, 2006), distúrbios psicológicos, provocados pelo aumento da agressividade (Choi *et al.*, 1990; Pope e Katz, 1994; Peluso *et al.*, 2000; Talih *et al.*, 2007), acne (Melnik *et al.*, 2007) e complicações hepáticas (Stimac *et al.*, 2002; Socas *et al.*, 2005; Kafrouni *et al.*, 2007). Promovem ainda a redução na produção natural de hormônios sexuais, o que pode causar, nos homens, diminuição na produção de espermatozóides, atrofia dos testículos e ginecomastia, enquanto, em mulheres, pode ocorrer aumento do clitóris, crescimento excessivo dos pêlos e masculinização na voz e na musculatura (Pope e Katz, 1994; Lise *et al.*, 1999; Mottram e George, 2000; Babigian e Silverman, 2001; de Luis *et al.*, 2001; Santos, 2003; Silva e Moreau, 2003; Neves *et al.*, 2005). Comumente, o usuário não tem informações a respeito das propriedades farmacológicas dos EAA e, muitas vezes, seus efeitos colaterais são subestimados (Muniz *et al.*, 1997; Iriart e Andrade, 2002).

Hemogénin[®] (HEM) (ou Anandrol), Deca-Durabolin[®] (DEC) e Durateston[®] (DUR), juntamente com outras substâncias químicas, são listados entre os compostos EAA, derivados sintéticos da testosterona, que geram efeitos anabolizantes mais freqüentemente utilizados, especialmente no Brasil (Manetta e Silveira, 2000; Mottram e George, 2000; Iriart e Andrade, 2002; Silva *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

Alguns estudos discutem uma possível relação causa-conseqüência da utilização de hormônios sexuais (estradiol, testosterona e seus derivados) com a ocorrência de alguns tipos de tumores, especialmente de fígado e próstata em humanos e em experimentos com animais (Carrasco *et al.*, 1985; Anthony, 1988; Taylor, 1987; Froehner *et al.*, 1999; Socas *et al.*, 2005; Bosland, 2006; Giannitrapani *et al.*, 2006; Ricke *et al.*, 2006; Gorayski, *et al.*, 2007), ao mesmo tempo em que estes hormônios não apresentaram potencial mutagênico em testes com *Salmonella/microsoma* e linhagens de células V79 de Hamster chinês (Lang e Redmann, 1979; Lang e Reimann, 1993) e testes de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e micronúcleo em medula óssea de

camundongo (Reimann *et al.*, 1996), sugerindo um efeito carcinogênico destas substâncias químicas por ação epigenética e não-genotóxica.

O teste para detecção de mutação e recombinação somática ("Somatic Mutation and Recombination Test" - SMART) foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984), sendo considerado um teste rápido, barato e que produz resultados confiáveis, inequívocos e altamente reproduzíveis. Utiliza como organismo teste a *Drosophila melanogaster*, que apresenta as vantagens de ter um curto período de geração, o que possibilita a rapidez do teste, um pequeno número de cromossomos e linhagens muito bem caracterizadas geneticamente. A *D. melanogaster* possui, ainda, o sistema enzimático P450 semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos (Baars, 1980 *apud* Graf *et al.*, 1984).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico de EEA, derivados sintéticos de testosterona, pelo teste de mutação e recombinação somática em células somáticas de *D. melanogaster*, por meio dos cruzamentos padrão (Graf *et al.*, 1989) e de alta capacidade de bioativação metabólica (Graf e van Schaik, 1992).

Material e métodos

Agentes químicos

A **Tabela 2.1** apresenta as especificações técnicas e químicas dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA) derivados da testosterona [Hemogenin® (HEM), Deca-durabolin® (DEC) e Durateston® (DUR)].

HEM (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) foi diluído em água destilada estéril. Devido à insolubilidade em água, DEC (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) e DUR (0,195; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125 mg/mL) foram diluídos em solução de tween-80 (3%) e etanol (1%) em água destilada estéril. Para a determinação das concentrações de DUR, foi considerado o total dos quatro ésteres de testosterona constituintes do composto químico, de acordo com Carreira Filho e Martins Filho (2005); Rangel *et al.* (2002) e Ferreira *et al.* (1998). Uretano (URE 0,891 mg/mL), etil carbamato ($C_3H_7NO_2/NH_2COOC_2H_5$, massa molecular 89.09 e CAS N° 51-79-6), Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland), foi utilizado como controle positivo, devido às suas propriedades mutagênicas bem estabelecidas (Frölich e Würzler, 1990; Graf e van Schaik, 1992; Abraham e Graf, 1996; Dogan *et al.*, 2005). Todas as diluições foram realizadas imediatamente antes do uso.

Obtenção de larvas e tratamentos

As linhagens mutantes de *D. melanogaster*, mwh (*y; mwh jv*), flare-3 (*flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) e ORR; flare-3 (*ORR; flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) foram mantidas em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820mL de água; 25g de fermento biológico; 11g de ágar; 150g de banana e 1g de nipagin).

Foram realizados os cruzamentos: 1] padrão (ST) (fêmeas virgens flare-3 cruzadas com machos mwh) (Graf *et al.*, 1984, 1989); e 2] de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) (fêmeas virgens ORR; flr-3 cruzadas com machos mwh) (Graf e van Schaik, 1992).

Os ovos foram coletados durante um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 h, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki®) e 5 mL das diferentes concentrações de EAA derivados sintéticos da testosterona (HEM, DEC e DUR). Como controle positivo de todos os experimentos foi utilizado URE (0,891 mg/mL). Para os controles negativos, os solventes empregados nas diluições das substâncias químicas (água destilada estéril nos experimentos com HEM e solução de tween-80 3% e etanol 1% em água destilada estéril para os experimentos com DEC e DUR). Os tratamentos foram realizados por um período de aproximadamente 48 horas (tratamento crônico), em frascos âmbar, para evitar a possibilidade de foto-degradação dos compostos.

Preparação das lâminas e análise do material

Adultos emergentes de ambos cruzamentos (ST e HB), portadores dos genótipos trans-heterozigotos marcados - MH (*mwh + / + flr³*) e heterozigotos balanceados - BH (*mwh + / + TM3, Bd^S*) foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas foram extraídas das moscas com auxílio de microscópio estereoscópico, Olympus®, utilizando-se um par de pinças entomológicas. As asas foram fixadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50ml de água) e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, marca Olympus®, com aumento de 400 X.

Os adultos são diferenciados fenotipicamente, pois o marcador *Bd^S* (presente nos descendentes BH) provoca, durante a metamorfose, um recorte na borda das asas, deixando-as com aspecto serrilhado, enquanto que os adultos MH apresentam asas com bordas lisas (Graf *et al.*, 1984).

Durante a análise das lâminas foi registrado o número de manchas mutantes, assim como o tipo e tamanho (número de células mutantes na mancha).

Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos dados foi feita de acordo com o teste do X^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$ de acordo com Frei e Würbler (1988), comparando as frequências obtidas com os grupos tratados e controle.

Resultados e discussão

Os três EAA derivados sintéticos da testosterona, Hemogenin® (HEM); Deca Durabolin® (DEC) e Durateston® (DUR), investigados neste trabalho, foram escolhidos devido à sua ampla e indiscriminada utilização por atletas e fisiculturistas, sem conhecimento de possíveis efeitos adversos, tais como efeitos genotóxicos. Para avaliar comparativamente o potencial genotóxico desses EAA, duas versões do SMART de asa em *Drosophila* (cruzamentos ST e HB) foram usados em dois experimentos repetidos. Os resultados obtidos em cada experimento foram agrupados, após verificar que não havia diferenças, estatisticamente significativas, entre os experimentos individuais.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de HEM (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL); DEC (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) e DUR (0,195; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125 mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril ou 1% Tween-80 + 3% etanol em água), estão apresentados nas **Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4**.

As frequências de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas), assim como o total de manchas, observadas nos tratados com as diferentes concentrações de HEM, DEC e DUR, foram estatisticamente não significativas ou inconclusivas ($\alpha > 0,05$) quando comparadas com as frequências de manchas mutantes observadas em seus respectivos controles negativo, para ambos os cruzamentos (ST e HB).

As **Figuras 2.1, 2.2 e 2.3**, mostram a distribuição das frequências de manchas por classe (número células mutantes/mancha) observadas em asas de descendentes MH, provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratados, respectivamente, com HEM, DEC e DUR e seus respectivos controles negativo e positivo.

O tratamento crônico de indivíduos MH com HEM, DEC e DUR, resultou em uma distribuição no tamanho de manchas mutantes, na qual as manchas simples pequenas (com uma célula) predominam, enquanto que as manchas maiores aparecem em frequência decrescente, de acordo com o aumento do

número de células mutantes presentes nas manchas. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Graf *et al.* (1984); Rodriguez-Arnaiz *et al.* (1996) e Spanó *et al.* (2001).

A prevalência de manchas pequenas, observadas nas asas dos descendentes MH de ambos os cruzamentos (ST e HB), demonstra que em todos os tratamentos, com todas as substâncias químicas, assim como nos respectivos controles, as mutações nas células dos discos imaginais de asas ocorreram numa fase tardia do desenvolvimento das larvas de *D. melanogaster*. Manchas formadas em estágios iniciais do desenvolvimento apresentam maior número de células, que é o caso da menor quantidade de manchas encontradas neste experimento.

Não houve diferenças estatisticamente significativas, nas freqüências totais de manchas mutantes, encontradas nos indivíduos dos grupos controle negativo, quando comparado com as freqüências observadas nos tratados com as diferentes concentrações dos EAA derivados sintéticos da testosterona HEM, DEC e DUR do cruzamento ST, quando comparado com os resultados observados, respectivamente, nesses mesmos grupos de tratamento, do cruzamento HB.

Os resultados negativos encontrados nos descendentes do cruzamento HB, permitem concluir que nas condições experimentais utilizadas, HEM, DEC e DUR não são agentes pró-mutágenos, e que as enzimas citocromo P450, altamente expressas na linhagem "ORR; flr³" não interferem no potencial genotóxico dessas substâncias.

As diferenças estatisticamente significativas observadas nas freqüências de manchas mutantes dos controles positivo (URE) de ambos os cruzamentos (ST e HB) comprova que URE é um pró-mutágeno, que tem sua genotoxicidade potencializada pelas enzimas citocromo P450, presentes em maior quantidade nos indivíduos descendentes do cruzamento HB.

Katz e Foley (1993) verificaram que temperaturas abaixo e acima de 25°C induzem aumentos nas freqüências de mutações espontâneas em *D. melanogaster*, sendo que as temperaturas em torno de 25°C são as que induzem menores taxas de mutação. Assim sendo, neste trabalho, durante o período de tratamento, as larvas foram mantidas em estufa B.O.D. (Biological

Oxygen Demand), sob temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, para evitar oscilações de temperatura que pudessem interferir nos resultados obtidos.

Os cruzamentos ST e HB permitem a obtenção de descendentes MH, identificados fenotipicamente pela borda lisa das asas; e descendentes BH, identificados pela borda da asa recortada. Quando o aumento na frequência de manchas mutantes observado nos descendentes MH é estatisticamente significativo, indica a ocorrência de mutações de ponto, aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas. Assim sendo, devem ser analisados os descendentes BH, nos quais as frequências de manchas mutantes são devidas apenas às mutações de ponto e aberrações cromossômicas. A diferença entre as frequências de manchas mutantes detectadas nos indivíduos MH e BH representa a frequência de recombinação mitótica. Como os resultados obtidos com os descendentes MH tratados com as substâncias químicas testadas (HEM, DEC e DUR), nas diferentes concentrações, foram estatisticamente não significativos em ambos os cruzamentos, não se justifica a análise dos indivíduos BH.

Foi verificado um aumento estatisticamente significativo ($\alpha < 0,05$) nas frequências de manchas mutantes simples pequenas, e no total de manchas, nos descendentes MH do cruzamento ST tratados com URE, quando comparado com as frequências de manchas mutantes observadas no controle negativo (água destilada estéril) dos experimentos com HEM. Nos lotes de experimentos com DEC e DUR, foi verificado nos descendentes MH do cruzamento ST tratados com URE, um aumento estatisticamente significativo ($\alpha < 0,05$) nas frequências de manchas mutantes simples pequenas, simples grandes, e no total de manchas, quando comparado com o controle negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água).

Nos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com URE, foi verificado um aumento estatisticamente significativo ($\alpha < 0,05$) nas frequências de todas as classes de manchas (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) e no total de manchas, quando comparado com as frequências de manchas mutantes dos controles negativos de todos os experimentos (HEM, DEC e DUR).

Uma vez observado o efeito positivo do URE, é possível afirmar que os resultados negativos obtidos com os EAA derivados sintéticos da testosterona, contidos nas substâncias químicas utilizadas, são resultados legítimos e não deficiência ou artefato da metodologia empregada.

HEM não apresentou efeitos genotóxicos, quando avaliado por meio do teste de troca entre cromátides irmãs em linfócitos humanos, na presença e na ausência de ativação metabólica (Ahmad *et al.*, 2003); e em ensaios com microrganismos e com células de mamíferos (aberrações cromossômicas em linfócitos humanos *in vitro*; e teste de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de roedores) (Holden *et al.*, 1999).

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos de genotoxicidade para as demais substâncias químicas avaliadas neste trabalho (DEC e DUR).

Resultados negativos também são descritos por Lang e Reimann (1993) e Lang e Redmann (1979), em testes com *Salmonella*/microsoma e linhagens de células V79 de hamster chinês; e Reimann *et al.* (1996), em testes de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e micronúcleo em medula óssea de camundongo, que avaliaram outros derivados de hormônios esteróides.

É importante considerar que testes com *Salmonella*/microsoma detectam apenas mutações de pequeno tamanho, o que se considera uma alteração em um número pequeno de pares de bases. Testes de aberrações cromossômicas e micronúcleo, por sua vez, já detectam alterações genéticas de maior tamanho, envolvendo, geralmente, quebras cromossômicas com proporções maiores de material genético. Alterações genéticas envolvendo proporções intermediárias de DNA e, ainda, a recombinação gênica, não seriam detectadas por estes testes tradicionais.

O teste de mutação e recombinação somática (SMART) desenvolvido por Graf *et al.* (1984) apresenta, além de todas as outras vantagens já descritas anteriormente, a capacidade de detectar um espectro maior de variabilidade de alterações genéticas, incluindo especialmente a recombinação somática, um dos principais fatores relacionados com a carcinogênese. Os resultados negativos obtidos com as quatro substâncias químicas mostram que também não possuem efeito recombinogênico.

Os resultados observados neste trabalho nos permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, os EAA derivados sintéticos da testosterona Hemogenin® (HEM), Deca Durabolin® (DEC) e Durateston® (DUR), não possuem efeitos genotóxicos (mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos) em células somáticas de *D. melanogaster*, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica pelo sistema enzimático citocromo P450.

Referências bibliográficas

- Abraham SK, Graf U. 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. Food Chem Toxicol 34:1-14.
- Agulló-Calatayud V, González-Alcaide G, Valderrama-Zurián JC, Aleixandre-Benavent R. 2007. Consumption of anabolic steroids in sport, physical activity and as a drug of abuse: an analysis of the scientific literature and areas of research. Br J Sports Med 41(8). Disponível *on-line*: <http://bjsm.bmj.com/content/vol41/issue8/>. Acesso em 26 jul 2007.
- Ahmad ME, Shadab GG, Azfer MA. 2003. Effect of oxymetholone on SCE frequency in human lymphocyte chromosomes in vitro. Teratog Carcinog Mutagen. Suppl 1, 267-272.
- Anthony PP. 1988. Liver tumours. Baillieres Clin Gastroenterol 2:501-522.
- Araújo LR, Andreolo J, Silva MS. 2002. Utilização de suplemento alimentar e anabolizantes por praticantes de musculação nas academias de Goiânia (GO). Rev Bras Ciên e Mov 10:13-18.
- Babigian A, Silverman RT. 2001. Management of gynecomastia due to use of anabolic steroids in bodybuilders. Plast Reconstr Surg 107:240-242.
- Bahrke MS; Yesalis CE; Brower KJ. 1998. Anabolic-androgenic steroid abuse and performance-enhancing drugs among adolescents. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 7:821-38.
- Bonaccorsi AC. 2001. Andropausa: Insuficiência Androgênica Parcial do Homem Idoso - Uma Revisão. Arq Bras Endocrinol Metab 45:123-133.
- Bosland MC. 2006. Sex steroids and prostate carcinogenesis: integrated, multifactorial working hypothesis. Ann N Y Acad Sci 1089:168-176.
- Cairolí CED. 2004. Deficiência androgênica no envelhecimento masculino (DEAM). AMRIGS 48:291-299.
- Carrasco D, Prieto M, Pallardó L, Moll JL, Cruz JM, Berenguer J. 1985. Multiple hepatic adenomas after long-term therapy with testosterone ananthate – Review of the literature. J Hepatol 1:573-578.
- Carreira Filho D, Martins Filho J. 2005. Prevalência do uso de substâncias químicas entre adolescentes, com finalidade de modelagem corporal. Rev Bras Ci Esp 27:93-111.

- Choi PYL, Parrott AC, Cowan D. 1990. High-dose anabolic steroids in strength athletes: Effects upon hostility and aggression. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* :349-356.
- Clark BM, Schofield RS. 2005. Dilated cardiomyopathy and acute liver injury associated with combined use of ephedra, gamma-hydroxybutyrate, and anabolic steroids. *Pharmacotherapy* 25:756-761.
- Comhaire FH. 2000. Andropause: Hormone replacement therapy in the ageing male. *Eur Urol* 38:655-662.
- Dal Pizzol Tda S; Branco MM; Carvalho RM; Pasqualotti A; Maciel EN; Migott AM. 2006. Uso não-médico de medicamentos psicoativos entre escolares do ensino fundamental e médio no sul do Brasil. *Cad Saúde Pública* 22:109-115.
- de Luis DA, Aller R, Cuéllar LA, Terroba C, Romero E. 2001. Anabolizantes esteróideos y ginecomastia. Revisión de la literatura. *An Med Interna* 18:489-491.
- De Micheli D, Formigoni ML. 2004. Drug use by Brazilian students: associations with family, psychosocial, health, demographic and behavioral characteristics. *Addiction* 99:570-578.
- Dogan EE, Yesilada E, Ozata L, Yologlu S. 2005. Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. *Drug Chem Toxicol* 28:289-301.
- Dourado VZ, Godoy I. 2004. Muscle reconditioning in COPD: main interventions and new tendencies. *Rev Bras Med Esporte* 10:335-338.
- Elliot DL, Cheong J, Moe EL, Goldberg L. 2007. Cross-sectional study of female students reporting anabolic steroid use. *Arch Pediatr Adolesc Med* 161:572-577.
- Evans N. 1997. Gym and tonic: profile of 100 male steroids users. *Br J Sports Med* 31:54-58.
- Faigenbaum AD, Zaichkowsky LD, Gardner DE, Micheli LJ. 1998. Anabolic steroid use by male and female middle school students. *Pediatrics* 101:E6.
- Ferreira IM, Verreschi IT, Nery LE, Goldstein RS, Zamel N, Brooks D, Jardim JR. 1998. The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body

- mass and respiratory muscles in undernourished COPD patients. *Chest* 114:19-28
- Frei H, Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.
- Froehner M, Fischer R, Leike S, Hakenberg OW, Noack B, Wirth MP. 1999. Intratesticular leiomyosarcoma in a young man after high dose doping with Oral-Turinabol: a case report. *Cancer* 86:1571-1575.
- Frölich A, Würigler FE. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244:201-208.
- Giannitrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'Alessandro N, Montalto G. 2006. Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann N Y Acad Sci* 1089:228-236.
- Gorayski PM, Thomas AC, Thompson CH, Subhash HS. 2007. Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use. *Br J Sports Med* [Epub ahead of print], Disponivel *on-line*: <http://bjsm.bmj.com/cgi/rapidpdf/bjsm.2007.039321v2>. Acesso em 28 jul 2007.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würigler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.
- Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.
- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Graf U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51:168-173.
- Hartgens F, Kuipers H. 2004. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sport Med* 34:513-554.

- Holden HE, Stoll RE, Blanchard KT. 1999. Oxymetholone: II. Evaluation in the Tg-AC transgenic mouse model for detection of carcinogens. *Toxicol Pathol.* 27(5), 507-512.
- Iñigo MÁ, Arrimadas E, Arroyo D. 2000. Estudio de 43 ciclos de tratamiento com anabolizantes esteroideos en depostistas: usos y efectos secundários. *Rev Clin Esp* 200:133-138.
- Iriart JAB, Andrade TM. 2002. Musculação. Uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública* 18:1379-1387.
- Jazayeri SMHM, Amani R. 2004. Nutritional knowledge, attitudes and practices of bodybuilding trainers in Ahwaz, Iran. *Pak J Nutr* 3:228-231.
- Kafrouni MI, Anders RA, Verma S. 2007. Hepatotoxicity associated with dietary supplements containing anabolic steroids. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:809-812.
- Kimbble MW, Ross MB. 1987. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. *Clinic Pharmaceutic* 6:686-692.
- Kintz P, Cirimele V, Sachs H, Jeaneau T, Ludes B. 1999. Testing for anabolic steroids in hair from two bodybuilders. *Forensic Sci Int* 101:209-216.
- Kindermann W. 2006. Kardiovaskuläre Nebenwirkungen von anabol-androgenen Steroiden. *Herz* 31:566-573.
- Kindlundh AM, Hagekull B, Isacson DG, Nyberg F. 2001. Adolescent use of anabolic-androgenic steroids and relations to self-reports of social, personality and health aspects. *Eur J Pub Health* 11:322-328.
- Korkia P, Stimson GV. 1997. Indication of prevalence, practice and effects of anabolic steroid use in Great Britain. *Int J Sports Med* 18:557-562.
- Labre MP. 2002. Adolescent boys and the muscular male body ideal. *J adolesc Health* 30:233-242.
- Lang R, Redmann U. 1979. Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 67:361-365.
- Lang R, Reimann R. 1993. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames

- Salmonella*/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. Environ Mol Mutagen 21:272-304.
- Lima DR. 2004. Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia. Rio de Janeiro: Medsi, 2215p.
- Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros T. 1999. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. Rev Ass Med Brasil 45:364-370.
- Lucas ACS, Parente RCP, Picanço NS, Conceição DA, Costa KRC, Magalhães IRS, Siqueira JCA. 2006. Uso de psicotrópicos entre universitários da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, Brasil. Cad. Saúde Pública 22:663-671.
- Manetta MCP, Silveira DX. 2000. Uso abusivo de esteróides anabolizantes androgênicos. Psiquiatria na Prática Médica, 33(4). Disponível *on-line*: http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/atu1_04.htm. Acesso em 20 jul 2007.
- Melnik B, Jansen T, Grabe S. 2007. Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem. JDDG 5:110-117.
- Morales A, Buvat J, Gooren LJ, Guay AT, Kaufman JM, Tan HM, Torres LO. 2004. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. J Sex Med 1:69-81.
- Motran DR, George AJ. 2000. Anabolic steroids. Baillieres Clin Endocrinol Metab 14:55-69.
- Muniz M, Affonso R, Costa VR. 1997. Musculatura de risco: uso indiscriminado de anabolizantes prejudica a saúde de jovens. Ciência Hoje 22:18-23.
- Naylor AH, Gardner D, Zaichkowsky L. 2001. Drug use patterns among high school athletes and nonathletes. Adolescence 36:627-639.
- Neves CN, Souza MOT, Pereira RVA. 2005. Esteróides anabolizantes: implicações sociofisiológicas em academias. Rio de Janeiro: Colina Ed., 102p.
- Pallesen S, Josendal O, Johnsen BH, Larsen S, Molde H. 2006. Anabolic steroid use in high school students. Subst Use Misuse 41:1705-1717.
- Peluso MAM, Assuncao SSM, Araujo LASB, Andrade LHSG. 2000. Alteracoes psiquiatricas associadas ao uso de anabolizantes. Rev Psiquiatr Clín 27:229-236.

- Pope HG, Katz DL. 1988. Affective and psychotic syndromes associated with use of anabolic steroids. *Am J Psychiatry* 145:487-490.
- Pope HG, Katz DL. 1994. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry* 51:375-382.
- Rangel AA, Mendes RP, Clapauch R, Barros JC, Lordello S. 2002. Síndrome de Klinefelter associada a lupus eritematoso sistêmico: Interferência dos esteróides sexuais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46:299-305.
- Reimann R, Kalweit S, Lang R. 1996. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex hormones. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. *Environ Mol Mutagen* 28:133-144.
- Rich JD, Dickinson BP, Feller A, Pugatch D, Mylonakis E. 1999. The infectious complications of anabolic-androgenic steroids injection. *Int J Sports Med* 20:563-566.
- Ricke WA, Ishii K, Ricke EA, Simko J, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR. 2006. Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis. *Int J Cancer* 118:2123-2131.
- Rodriguez-Arnaiz R, Orozco-Soto P, Gaytán-Oyarzún JC and Graf U (1996) Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 351: 133-146.
- Santos AF, Mendonça PMH, Santos LA, Silva NF, Tavares JKL. 2006. Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE). *Psicologia em Estudo* 11:371-380.
- Santos AM. 2003. O mundo anabólico: análise do uso de esteróides anabólicos nos esportes. Barueri: Manole, 275p.
- Silva LSMF, Moreau RLM. 2003. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev Bras Ci Farm* 39:327-333.

- Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. 2002. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte* 8:235-243.
- Socas L, Zumbado M, Pérez-Luzardo O, Ramos A, Pérez C, Hernández JR, Boada LD. 2005. Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br J Sports Med*, 39(5). Disponível *on-line*: <http://bjsm.bmj.com/cgi/reprint/39/5/e27>. Acesso em 27 jul 2007.
- Souza ES, Fisberg M. 2002. Uso de esteróides anabolizantes na adolescência. *Brazil Ped News*, 4(1). Disponível *on-line*: <http://www.brazilpednews.org.br/mar2002/bnp3302.pdf>. Acesso em: 27 mar 2005.
- Spanó MA, Frei H, Würglér FE and Graf U (2001) Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16(5):385-394.
- Stimac D, Milić S, Dintinjana RD, Kovac D, Ristić S. 2002. Androgenic/Anabolic steroid-induced toxic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 35:350-352.
- Talih F, Fattal O, Malone D. 2007. Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. *Cleve Clin J Med*, 74(5), 341-352.
- Taylor W. 1987. Risk factors associated with the use of sex hormones. *Anticancer Res* 7:943-948.
- vandenBerg P, Neumark-Sztainer D, Cafri G, Wall M. 2007. Steroid use among adolescents: longitudinal findings from Project EAT. *Pediatrics* 119:476-86.
- Wanjek B, Rosendahl J, Strauss B, Gabriel HH. 2007. Doping, drugs and drug abuse among adolescents in the State of Thuringia (Germany): prevalence, knowledge and attitudes. *Int J Sports Med* 28:346-353.
- Yesalis CE, Barsukiewicz CK, Kopstein AN, Bahrke MS. 1997. Trends in anabolic-androgenic steroid use among adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 151:1197-1206.

Tabela 2.1 - Esteróides anabólico-androgênicos derivados de testosterona utilizados nos tratamentos de larvas de *Drosophila melanogaster* para o teste de detecção de mutação e recombinação somática

Nome comercial	Princípio ativo	Conteúdo (mg)	CAS N°	Apresentação	Excipiente	Fabricante	Lote
Hemongenin® (HEM)	Oximetolona	50	434-07-1	Comprimido	Amido de milho, estearato de magnésio, lactose monohidratada e povidona K30	Aventis Pharma Ltda. (Suzano – SP)	500867
Deca-Durabolin® (DEC)	Decanoato de nandrolona	50	360-70-03	Solução injetável em ampola de 1mL	Óleo de amendoim e álcool benzílico	Organon (São Paulo - SP)	18124
Durateston® (DUR)	Propionato de testosterona	30	57-85-2	Solução injetável em ampola de 1mL	Óleo de amendoim e álcool benzílico	Organon do Brasil (São Paulo - SP)	18042
	Fempropionato de testosterona	60	1255-49-8				
	Isocaproato de testosterona	60	15262-86-9				
	Decanoato de testosterona	100	5721-91-5				

Tabela 2.2 - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante Hemogenin® (HEM), e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

Tratamentos Concentrações (mg/mL)	Nº de moscas (<i>n</i>)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a												Total de manchas mwh ^c
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b			Manchas simples grandes (>2 céls) ^b			Manchas gêmeas			Total de manchas			
		<i>M</i> = 2			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 5			<i>m</i> = 2			
Cruzamento ST														
Controle negativo	50	0,32	(16)		0,06	(03)		0,02	(01)		0,40	(20)		20
Hem 0,625	50	0,26	(13)	-	0,04	(02)	i	0,02	(01)	i	0,32	(16)	-	16
Hem 1,25	53	0,28	(15)	-	0,04	(02)	i	0,00	(00)	i	0,32	(17)	-	17
Hem 2,5	50	0,42	(21)	i	0,00	(00)	-	0,00	(00)	i	0,42	(21)	-	20
Controle positivo	50	1,34	(67)	+	0,16	(08)	i	0,06	(03)	i	1,56	(78)	+	78
Cruzamento HB														
Controle negativo	50	0,36	(18)		0,08	(04)		0,02	(01)		0,46	(23)		22
Hem 0,625	50	0,46	(23)	i	0,04	(02)	i	0,00	(00)	i	0,50	(25)	-	25
Hem 1,25	50	0,42	(21)	i	0,02	(01)	-	0,00	(00)	i	0,44	(22)	-	22
Hem 2,5	50	0,28	(14)	-	0,08	(04)	i	0,06	(03)	i	0,42	(21)	-	21
Controle positivo	50	4,84	(242)	+	0,86	(43)	+	0,72	(36)	+	6,42	(321)	+	316

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^b Incluindo manchas simples *fir*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2.3 - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\approx$ 48h) com diferentes concentrações (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante Deca Durabolin® (DEC), e seus respectivos controles negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

Tratamentos Concentrações (mg/mL)	Nº de moscas (<i>n</i>)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a												Total de manchas mwh ^c
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>M</i> = 2			Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5			Manchas gêmeas <i>m</i> = 5			Total de manchas <i>m</i> = 2			
Cruzamento ST														
Controle negativo	50	0,42	(21)		0,02	(01)		0,10	(05)		0,54	(27)		27
DEC 0,15625	58	0,29	(17)	-	0,07	(04)	i	0,02	(01)	-	0,38	(22)	-	22
DEC 0,3125	48	0,38	(18)	-	0,04	(02)	i	0,04	(02)	i	0,46	(22)	-	21
DEC 0,625	43	0,33	(14)	-	0,05	(02)	i	0,02	(01)	-	0,40	(17)	-	17
DEC 1,25	40	0,25	(10)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	-	0,25	(10)	-	10
DEC 2,5	29	0,21	(06)	-	0,03	(01)	i	0,00	(00)	-	0,24	(07)	-	7
Controle positivo	50	1,20	(60)	+	0,14	(07)	+	0,10	(05)	i	1,44	(72)	+	72
Cruzamento HB														
Controle negativo	55	0,33	(18)		0,07	(04)		0,05	(03)		0,45	(25)		25
DEC 0,15625	61	0,31	(19)	-	0,05	(03)	i	0,05	(03)	i	0,41	(25)	-	24
DEC 0,3125	59	0,25	(15)	-	0,07	(04)	i	0,07	(04)	i	0,39	(23)	-	23
DEC 0,625	60	0,28	(17)	-	0,05	(03)	i	0,03	(02)	i	0,37	(22)	-	21

Tabela 2.3 (cont.)

DEC 1,25	79	0,32 (25)	-	0,11 (09)	i	0,04 (03)	i	0,47 (37)	-	37
DEC 2,5	57	0,37 (21)	i	0,02 (01)	-	0,05 (03)	i	0,44 (25)	-	22
Controle positivo	60	5,22 (313)	+	1,02 (61)	+	0,87 (52)	+	7,10 (426)	+	417

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Tabela 2.4 - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), após tratamento crônico ($\simeq$ 48h) com diferentes concentrações (0,195; 0,39; 0,79; 1,56 e 3,125 mg/mL) do anabolizante Durateston® (DUR), e seus respectivos controles negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

Tratamentos Concentrações (mg/mL)	Nº de moscas (<i>n</i>)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a												Total de manchas mwh ^c	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>M</i> = 2				Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5			Manchas gêmeas <i>m</i> = 5			Total de manchas <i>m</i> = 2			
Cruzamento ST															
Controle negativo	53	0,38	(20)		0,08	(04)		0,06	(03)		0,51	(27)		29	
DUR 0,195	45	0,36	(16)	-	0,07	(03)	i	0,09	(04)	i	0,51	(23)	-	35	
DUR 0,39	58	0,28	(16)	-	0,02	(01)	-	0,02	(01)	i	0,31	(18)	-	45	
DUR 0,78	50	0,44	(22)	i	0,12	(06)	i	0,02	(01)	i	0,58	(29)	-	45	
DUR 1,56	32	0,19	(06)	-	0,06	(02)	i	0,06	(02)	i	0,31	(10)	-	41	
DUR 3,125	36	0,25	(09)	-	0,06	(02)	i	0,03	(01)	i	0,33	(12)	-	12	
Controle positivo	50	1,14	(57)	+	0,24	(12)	+	0,14	(07)	i	1,52	(76)	+	76	
Cruzamento HB															
Controle negativo	54	0,69	(37)		0,11	(06)		0,11	(06)		0,91	(49)		49	
DUR 0,195	40	0,53	(21)	-	0,05	(02)	i	0,03	(01)	-	0,60	(24)	-	23	
DUR 0,39	54	0,48	(26)	-	0,17	(09)	i	0,09	(05)	i	0,74	(40)	-	39	
DUR 0,78	50	0,76	(38)	-	0,06	(03)	i	0,04	(02)	-	0,86	(43)	-	43	

Tabela 2.4 (cont.)

DUR 1,56	45	0,78 (35)	-	0,16 (07)	i	0,07 (03)	i	1,00 (45)	-	45
DUR 3,125	38	0,63 (24)	-	0,11 (04)	i	0,03 (01)	-	0,76 (29)	-	29
Controle positivo	54	5,52 (298)	+	0,78 (42)	+	0,35 (19)	+	6,65 (359)	+	357

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würdler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

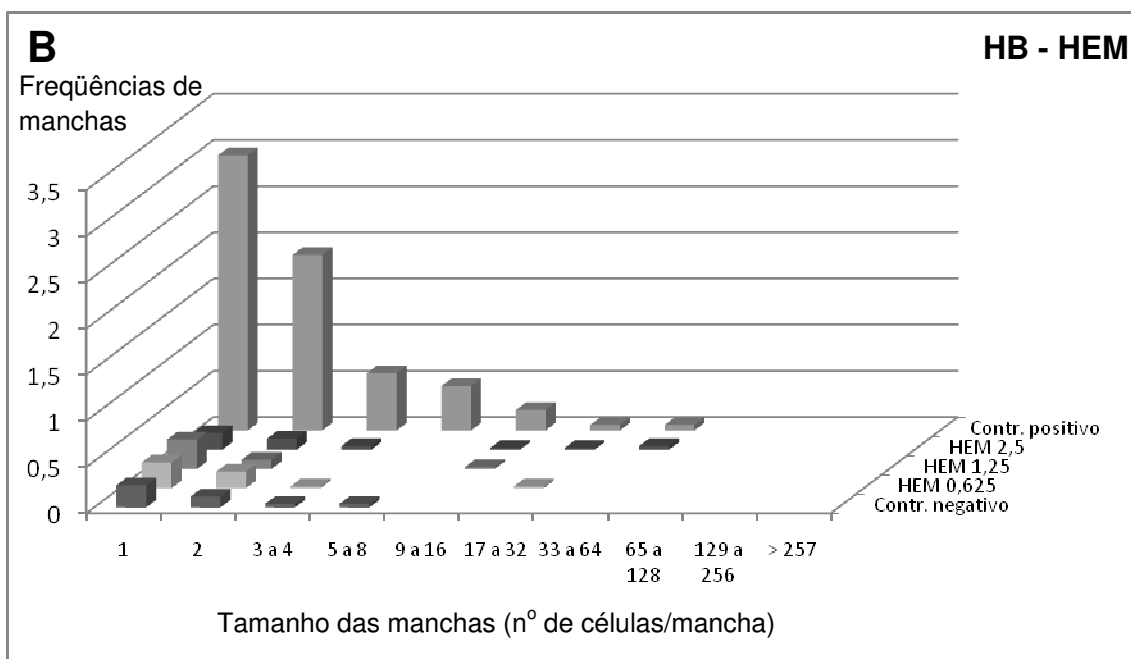
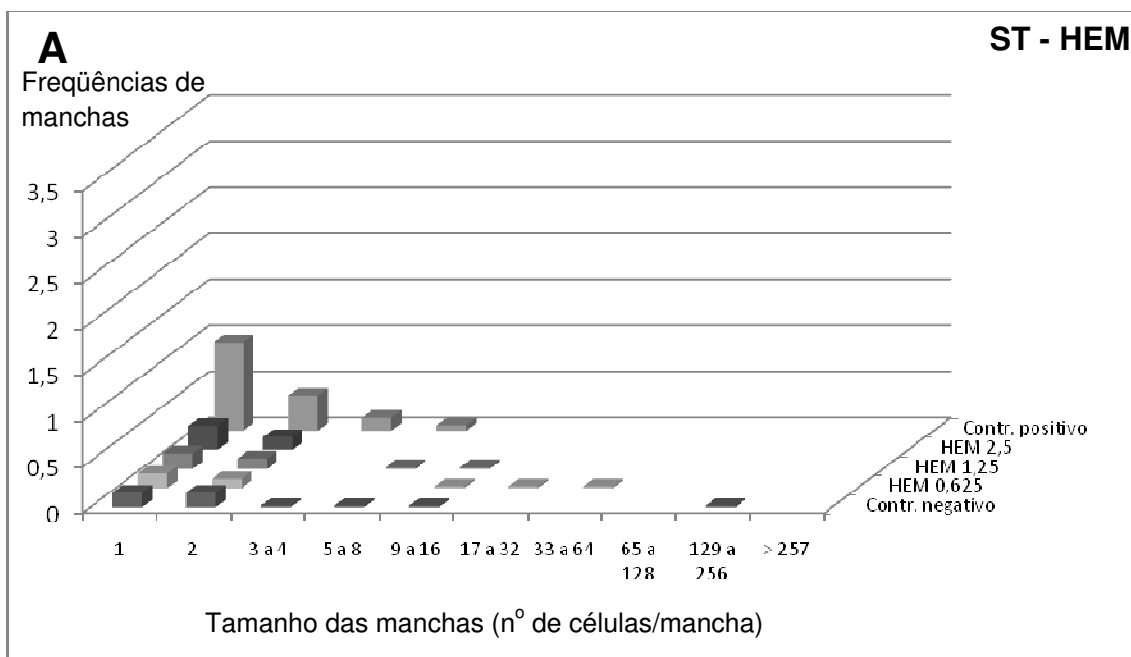


Figura 2.1 - Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Hemogenin® (HEM) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril).

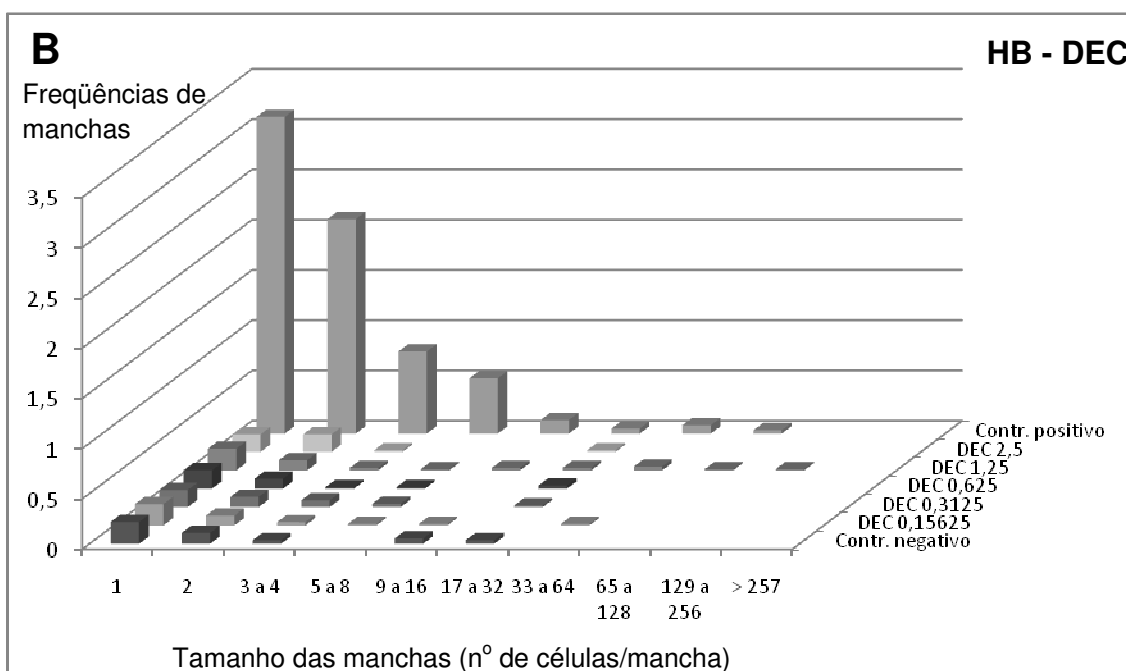
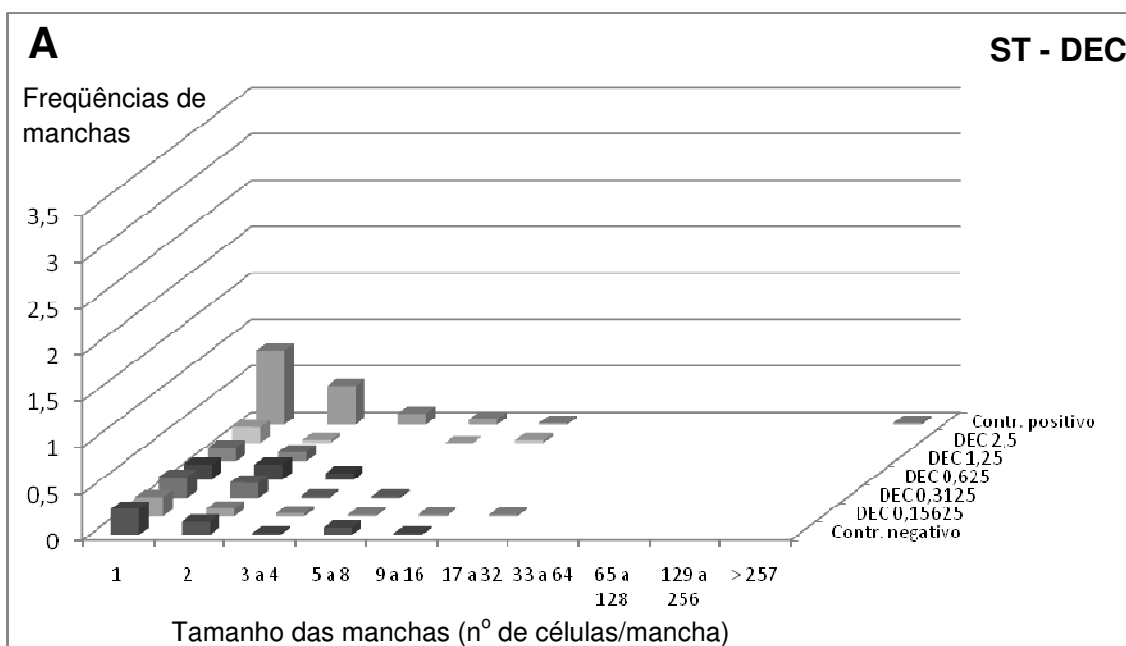


Figura 2.2 - Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Deca Durabolin® (DEC) (0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água).

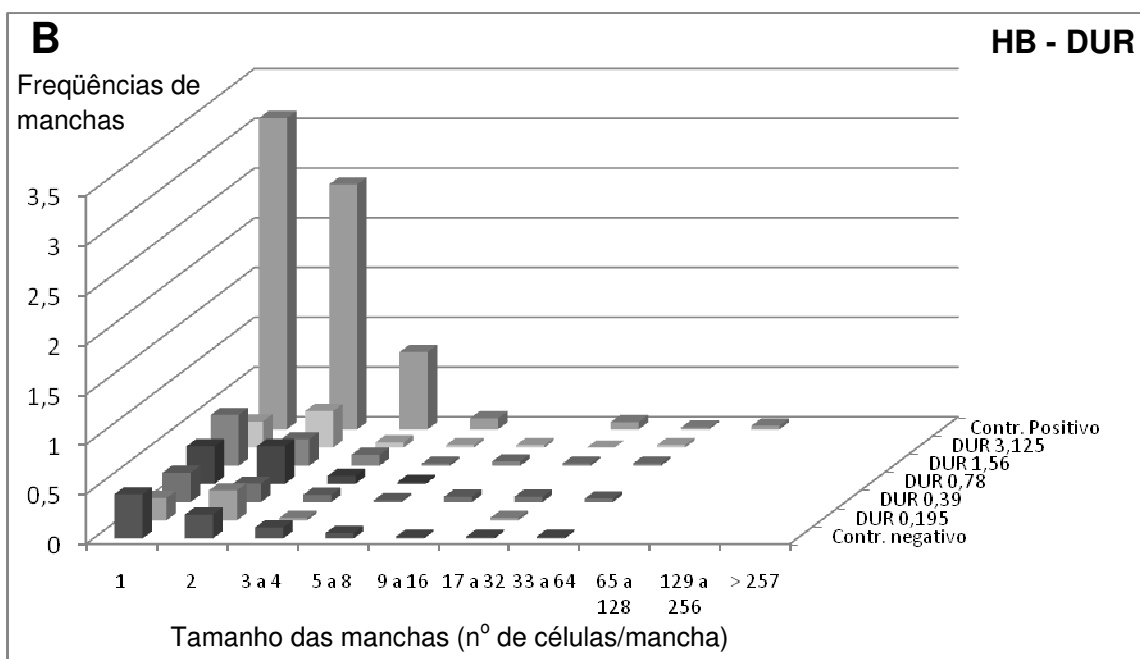
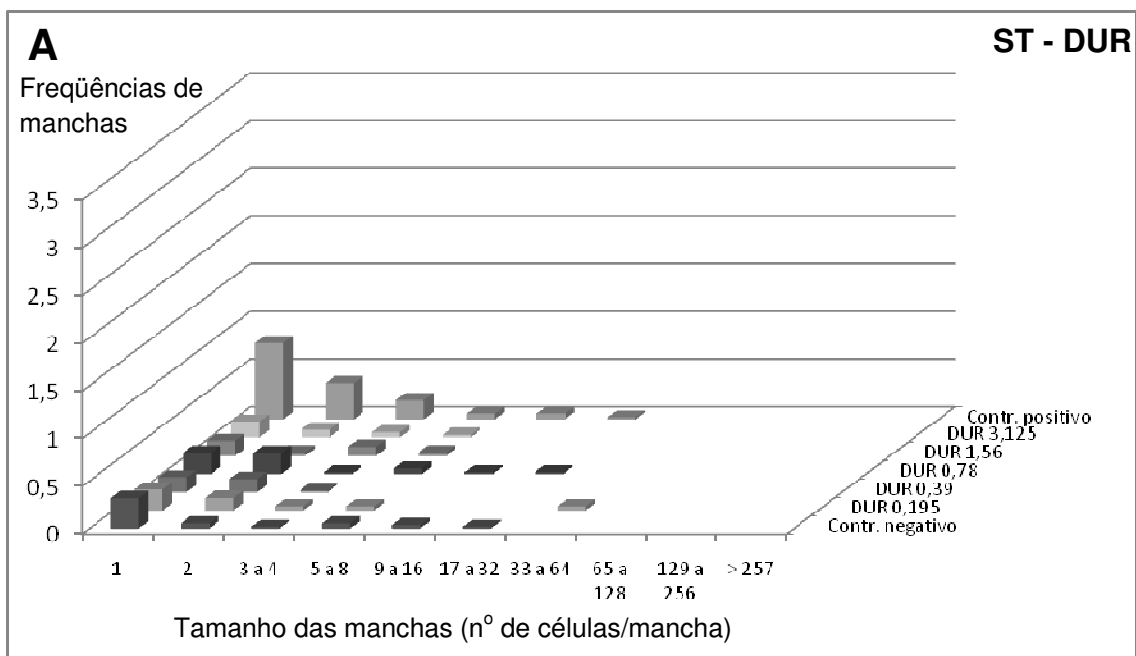


Figura 2.3. Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Durateston® (DUR) (0,195; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125mg/mL)e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (1% Tween-80 + 3% etanol em água).

CAPÍTULO III

**Efeitos inibidores do estanozolol sobre ação genotóxica do etilcarbamato
em células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Efeitos inibidores do estanozolol sobre ação genotóxica do etilcarbamato em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Bruno Lassmar Bueno Valadares e Mário Antônio Spanó

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia (MG) Brasil

Running title: Efeitos protetores do estanozolol em *Drosophila melanogaster*

Autor para correspondência: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese, Bloco D – sala 2D52, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia (MG) Brasil.
Tel. +55 34 3218 2505.
E-mail: maspano@ufu.br

Fontes de financiamento:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Universidade Federal de Uberlândia

Palavras chave: Winstrol Depot, Teste de Mutação e Recombinação Somática
– SMART, uretano.

Resumo

Estanozolol, nome comercial Winstrol Depot®, é um derivado sintético da testosterona, usado no tratamento de anemias, angioedema hereditário e como esteróide anabólico androgênico (EAA) por atletas fisiculturistas. Este composto interage com o citocromo P450, formando um complexo com alta afinidade de ligação. Este trabalho avaliou, por meio do Teste de Mutação e Recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) os efeitos do estanozolol associado ao uretano (URE), um conhecido agente genotóxico ativado metabolicamente pelo citocromo P450. Larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos padrão (ST), fêmeas *flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh*, e de alta capacidade de ativação metabólica (HB), fêmeas *ORR; flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* cruzadas com machos *mwh*. Foram tratadas aproximadamente por um período de 48h com diferentes concentrações (0.625; 1.25 e 2.5 mg/mL) de WIN isoladamente e em associação com URE (0,891 mg/mL). Os resultados observados em ambos os cruzamentos sugerem que WIN, nestas condições experimentais não apresentaram atividade mutagênica, e, nos tratamentos combinados de WIN e URE, foi observado em todas as concentrações de WIN testadas, uma inibição dos efeitos do URE. Provavelmente, este efeito é um resultado da interação entre o WIN e o P450. A redução da atividade genotóxica do URE foi diretamente proporcional à dose de WIN. Este trabalho sugere a necessidade de mais estudos relacionados ao metabolismo de agentes xenobióticos, como os EAA, pelo citocromo P450 e sua relação com a carcinogênese.

Key words: Winstrol Depot, Somatic Mutation and Recombination Test – SMART, uretano.

Abstract

Stanozolol, commercial name Winstrol® (WIN), is a synthetic derivative of testosterone, used for the treatment of anemia, hereditary angioedema and used by sportsmen like anabolic-androgenic steroid. This drug interacts with cytochrome P450, forming a high-affinity ligand complex. This study evaluated, by means of wing spot test of *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART), the effects of stanozolol associated with urethane (URE), known genotoxic agent metabolized by cytochrome P450. Third-instar larvae derived from standard cross (ST), where *flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females were mated with *mwh* males, and high bioactivation cross (HB), where *ORR; flr3 / In(3LR) TM3, ri p^osep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* females were mated with *mwh* males, were treated approximately 48 h with different concentrations (0.625; 1.25 e 2.5 mg/mL) of WIN isolated and in association with URE (0.891 mg/mL). The results observed in both crosses suggest that WIN at these experimental conditions, showed non-mutagenic effects and combined treatment of WIN and URE displayed, throughout all concentrations assayed, an inhibition of the effects of URE by WIN, probably this effect is a result of the inhibit-interaction among WIN and cytochrome P450. The relative proportion of this inhibition was proportional to the concentrations applied. This work proposes the necessity of more studies about metabolism of xenobiotics agents, like EAA, by cytochrome P450 and their relation with genotoxicity.

Introdução

O estanozolol, conhecido comercialmente como Winstrol Depot® (WIN), é um esteróide androgênico anabólico (EAA) sintético derivado da testosterona, utilizado no tratamento da anemia (Reynolds e Prasad *apud* Rendic e Ruf, 1988), e do angioedema hereditário, para diminuir a frequência e a severidade das crises (Sanofi-Synthelabo, 1999). Este EAA é usado por praticantes de musculação, geralmente em combinação com outros agentes anabolizantes, assim como com suplementos, que melhoram o condicionamento físico, sendo listado entre os anabolizantes mais utilizados por homens e mulheres fisiculturistas (Tricker *et al.*, 1989; Manetta e Silveira, 2000; Mottram e George, 2000; Iriart e Andrade, 2002; Silva *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006).

Organismos vivos expostos a agentes xenobióticos apresentam respostas biológicas (farmacológicas ou tóxicas) que geralmente dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não (Oshima-Franco e Franco, 2003). A biotransformação de agentes xenobióticos ocorre no interior das células, promovidas por enzimas que modificam estas substâncias, geralmente lipossolúveis, em estruturas polares, solúveis em água e de fácil eliminação (Meyer, 1996). Os agentes xenobióticos podem, na biotransformação, ser inativados, ou gerar metabólitos com maior atividade ou com propriedades tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas (Oshima-Franco e Franco, 2003).

As enzimas microsossomais do fígado, citocromo P450, formam uma grande família de hemoproteínas envolvidas especialmente no metabolismo de substâncias (agentes xenobióticos), como também na biossíntese de lipídeos, esteróides, vitaminas e outros metabólitos naturais das células (Chefson e Auclair, 2006), sendo essenciais para todo organismo vivo, tanto procariontes quanto eucariontes (Nebert e Gonzalez, 1987; Nebert *et al.*, 1989).

Interações entre o estanozolol e enzimas citocromo P450, obtidas de fígado de roedores, formando um complexo com alta afinidade de ligação, são descritas por Rendic e Ruf (1988). Nakajin *et al.* (1989) relatam a inibição de

enzimas citocromo P450 de testículos de suínos, devido à interação com o estanozolol.

Efeitos adversos, tais como efeitos carcinogênicos, têm sido atribuídos a tratamentos com hormônios androgênicos como o estanozolol (Sanofi-Synthelabo, 1999) e outros derivados de hormônios sexuais como estradiol, testosterona (Carrasco *et al.*, 1985; Taylor, 1987; Anthony, 1988; Froehner *et al.*, 1999; Socas *et al.*, 2005; Bosland, 2006; Giannitrapani *et al.*, 2006; Ricke *et al.*, 2006; Gorayski *et al.*, 2007). No entanto, não há na literatura especializada, trabalhos que comprovem os efeitos genotóxicos e carcinogênicos destas substâncias.

A *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarionte muito bem caracterizado geneticamente, que apresenta curto período de geração, pequeno número de cromossomos, e sistema enzimático (citocromo P450) semelhante ao de mamíferos (Baars, 1980 *apud* Graf *et al.*, 1984). A *D. melanogaster* é utilizada na detecção de agentes genotóxicos diretos e indiretos, por meio do teste de mutação e recombinação somática ("Somatic Mutation and Recombination Test" – SMART), desenvolvido por Graf *et al.* (1984), um teste rápido, barato e que produz resultados confiáveis, inequívocos e altamente reproduzíveis.

A influência do sistema enzimático citocromo P450, na atividade genotóxica de agentes químicos, pode ser verificada pelo SMART devido à utilização de dois tipos de cruzamentos distintos: 1] cruzamento padrão (ST) (machos da linhagem "mwh" (*mwh* +/ *mwh* +) cruzados com fêmeas virgens da linhagem "flr³" (+ *flr*³/ + *TM3*, *Bd*^S) (Graf *et al.*, 1984, 1989); 2] cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) (machos "mwh" (*mwh* +/ *mwh* +) cruzados com fêmeas virgens "ORR; flr³" (*ORR/ORR*; + *flr*³ / + *TM3* *Bd*^S) (Graf e van Schaik, 1992). A linhagem "ORR; flr³" difere da linhagem "flr³" por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R, construída por Frölich e Würigler (1989), com genes para resistência ao DDT, e uma maior expressão das enzimas citocromo P450 (Hällström e Blanck, 1985 *apud* Graf e van Schaik, 1992), as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de promutágenos e procarcinógenos (Dapkus e Marell, 1977 *apud* Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a genotoxicidade do WIN, isoladamente, e os seus efeitos moduladores, quando associado ao pró-mutágeno etilcarbamato (uretano - URE), por meio do SMART de asa de *D. melanogaster*.

Material e métodos

Agentes químicos

Winstrol Depot® (WIN), estanozolol (7 β -hidroxi-17-metil-5 α -androstando[3,2-c]pirazol; C₂₁H₃₂N₂O; massa molecular 328,49; CAS N° 10418-03-8; apresentado na forma de solução injetável, em ampolas de 1mL; distribuído por Zambon Laboratórios Farmacêuticos LTDA., São Paulo - SP – Brasil. Etilcarbamato (Uretano - URE); (C₃H₇NO₂/NH₂COOC₂H₅; massa molecular 89,09; CAS N° 51-79-6; fabricado por Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). As substâncias químicas foram diluídas em água destilada estéril, imediatamente antes do uso. A **Figura 3.1** mostra as fórmulas estruturais do WIN e URE.

Linhagens de moscas, cruzamentos e tratamentos

Foram utilizadas as linhagens de *Drosophila melanogaster* "multiple wing hairs" (mwh), flare³ (flr³) e "Oregon R, flare³" (ORR; flr³). A linhagem "mwh" (com constituição genética *y; mwh jv*) possui o marcador *mwh* que se localiza no cromossomo 3 (3-3,0) e que tem sua manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais pêlos por célula da asa. A linhagem "flr³" (de constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) possui o marcador *flr³*, também no cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8) e sua manifestação fenotípica é caracterizada por um pêlo modificado em forma de chama. Sendo o marcador *flr³* letal em homozigose, esta linhagem apresenta um cromossomo balanceador TM3, Bd^S (Third Multiple 3, beaded-serrate) que mantém sua heterozigose (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). A presença deste balanceador é caracterizada fenotipicamente pela borda serrilhada da asa e também impede a ocorrência de recombinações, devido à presença de múltiplas inversões neste cromossomo (Lindsley e Zimm, 1992, *apud* Graf *et al.*, 1996).

Estas linhagens foram mantidas em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820mL de água; 25g de fermento biológico - *Sacharomyces cerevisiae*; 11g de ágar; 150g de banana e 1g de nipagin).

Foram realizados os seguintes cruzamentos: 1] **cruzamento padrão (ST)** (Graf *et al.*, 1984, 1989), no qual fêmeas virgens da linhagem “flr³” foram cruzadas com machos “mwh” ; 2] **cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB)** (Graf e van Schaik, 1992), no qual fêmeas virgens “ORR; flr³” foram cruzadas com machos “mwh”.

Ovos de ambos os cruzamentos foram coletados durante um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*S. cerevisiae*) suplementado com sacarose.

Após 72 ± 4 h, larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos ST e HB foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para os frascos de tratamento contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki®) e 5 mL de diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) de WIN, isoladamente, e associadas a URE 0,891 mg/mL. Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, água destilada esterilizada e URE (0,891 mg/mL).

Os tratamentos foram realizados em frascos âmbar para evitar a possibilidade de fotodegradação dos compostos. As larvas foram submetidas a tratamento crônico, por um intervalo de tempo de aproximadamente 48 horas, até o período em que estas sobem às paredes do frasco, passando ao estágio de pupa. Durante esse período as larvas permaneceram em condições de temperatura ambiente controlada (25°C) em câmara BOD (“Biological Oxygen Demand”) apropriada para manutenção de linhagens de *D. melanogaster*. De acordo com Katz e Foley (1993), temperaturas abaixo e muito diferentes de 25°C induzem aumentos na frequência de mutações espontâneas em *Drosophila melanogaster*.

Preparação das lâminas e análise do material

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos trans-heterozigotos marcados - MH (*mwh + / + flr³*) e heterozigotos balanceados - BH

(*mwh + / + TM3, Bd^S*) foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas foram extraídas das moscas sob microscópio estereoscópico, marca Olympus[®], utilizando-se um par de pinças entomológicas. As asas foram fixadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50ml de água) e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, marca Olympus[®], com aumento de 400 X.

Os adultos são diferenciados fenotipicamente, pois o marcador *TM3, Bd^S* provoca, durante a metamorfose, um recorte na borda das asas, deixando-as com aspecto serrilhado, enquanto que os adultos trans-heterozigotos apresentam a borda da asa lisa (Graf *et al.*, 1984).

Análise estatística

Durante a leitura das lâminas foi registrado o número de manchas mutantes, assim como o tipo e tamanho das mesmas. A análise estatística dos experimentos de genotoxicidade foi feita de acordo com o teste do X^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$ de acordo com Frei e Würzler (1988). Para avaliar o efeito modulador da genotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca foram comparadas aos pares (i.e. URE isoladamente vs. URE associado ao WIN) empregando o teste-U, não paramétrico, de Mann-Whitney e Wilcoxon, de acordo com Frei e Würzler (1995).

Resultados e discussão

O EAA derivado sintético da testosterona, Winstrol Depot® (WIN), investigado neste trabalho, foi escolhido devido à sua ampla e indiscriminada utilização por atletas e fisiculturistas, sem conhecimento dos seus possíveis efeitos adversos. Para avaliar o potencial genotóxico do WIN, foram usadas duas versões do SMART de asa em *D. melanogaster* (cruzamentos padrão – ST; e cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica - HB), em dois experimentos repetidos. Os resultados obtidos foram agrupados, após verificar que não havia diferenças, estatisticamente significativas, entre os experimentos individuais.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de WIN (0,625; 1,25; e 2,5 mg/mL), isoladamente, e os controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE), estão apresentados, respectivamente, nas **Tabelas 3.1 e 3.2**.

As freqüências de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes, gêmeas, e o total de manchas), observadas nos tratados com as diferentes concentrações de WIN, em ambos os cruzamentos, comparadas com as freqüências de manchas mutantes observadas no controle negativo, foram estatisticamente não significativas ($\alpha > 0,05$).

Assim sendo, nestas condições experimentais, WIN não é um agente genotóxico (mutagênico; clastogênico ou recombinogênico) direto ou indireto (pró-mutágeno), quando analisado por meio do teste de detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *D. melanogaster*. Os resultados negativos encontrados no cruzamento HB permitem concluir que as enzimas citocromo P450, altamente expressas na linhagem “ORR; flr³” não interferem no potencial genotóxico do WIN.

Após comprovar que WIN não possui efeitos genotóxicos em células somáticas de *D. melanogaster*, e diante de informações prévias de que WIN interage com enzimas citocromo P450, inibindo-as (Rendic e Ruf, 1988; Nakajin *et al.*, 1989), foram analisadas as séries tratadas com diferentes

concentrações de WIN (0,625; 1,25; e 2,5 mg/mL) associadas a URE (0,891 mg/mL).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, das séries co-tratadas com diferentes concentrações de WIN e URE, estão apresentados, respectivamente, nas **Tabelas 3.1** e **3.2**. Os controle negativo (água destilada estéril) e positivo (URE) são os mesmos das séries tratadas com WIN isoladamente, uma vez que todos os tratamentos foram realizados simultaneamente.

Para a análise estatística, os resultados observados nas moscas tratadas com WIN combinado com URE foram comparados com os dados dos correspondentes controles positivos. No cruzamento ST (**Tabela 3.1**), o tratamento simultâneo, entre todas as concentrações de WIN e URE, mostrou um efeito inibitório significativo contra a frequência de manchas simples pequenas e no total de manchas. Para as frequências de manchas simples grandes e gêmeas, foram encontradas diferenças estatisticamente inconclusivas para todas as concentrações de WIN associadas com URE, assim como para URE isoladamente.

No cruzamento HB (**Tabela 3.2**), o tratamento com URE, isoladamente, mostrou aumento estatisticamente significativo para todas as categorias de manchas mutantes, quando comparado com o controle negativo (água destilada estéril). Os co-tratamentos de URE com todas as concentrações de WIN, mostraram efeito inibitório significativo contra as frequências de todas as categorias de manchas mutantes, assim como no total de manchas.

Comparando-se os resultados obtidos nos tratamentos com URE em ambos os cruzamentos (ST e HB), apresentados respectivamente nas **Tabelas 3.1** e **3.2**, encontra-se uma diferença estatisticamente significativa entre os cruzamentos. Este dado é justificado pelo fato do URE ser uma substância que apresenta propriedades pró-mutagênicas muito bem estabelecidas, sendo estas, potencializadas pela ação metabólica do sistema enzimático citocromo P450 (Frölich e Würigler, 1990; Graf e van Schaik, 1992; Abraham e Graf, 1996; Dogan *et al.*, 2005).

Os aumentos estatisticamente significativos ($\alpha < 0,05$) observados nas frequências de manchas mutantes nos tratados com URE, quando comparado

com as frequências de manchas mutantes observadas no controle negativo, possibilitam afirmar que os resultados negativos obtidos com WIN, tanto em ST quanto HB são resultados legítimos e não deficiência ou artefato da metodologia empregada.

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos de genotoxicidade com WIN. No entanto, trabalhos com outros hormônios esteróides, e seus derivados sintéticos, também não apresentaram ação mutagênica em testes de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos, e micronúcleos em medula óssea de camundongo (Reimann *et al.*, 1996) e testes com *Salmonella*/microsoma e linhagens de células V79 de hamster chinês (Lang e Redmann, 1979; Lang e Reimann, 1993).

A inibição dos efeitos genotóxicos do URE pelo WIN, observada tanto em ST quanto HB, pode estar relacionada à interação do WIN com o citocromo P450, descrita por Rendic e Ruf (1988) e Nakajin *et al.* (1989). Os indivíduos descendentes do cruzamento ST, mesmo apresentando as enzimas do complexo citocromo P450 em expressões mais baixas, também são afetados pela presença do WIN.

Com base nos percentuais de inibição promovidos pelo WIN sobre os efeitos de URE, obteve-se os índices de correlação para os descendentes MH do cruzamento ST ($r = 0,981981$); e do cruzamento HB ($r = 0,95514$). Uma vez comprovada a correlação existente, determinou-se a regressão linear, que representa uma aproximação das correspondentes curvas de dose-resposta, apresentadas na **Figura 3.2**.

Os coeficientes de correlação entre o percentual de inibição na frequência total de manchas e as diferentes concentrações de WIN associadas ao URE, foram altamente significativos para os descendentes do cruzamento ST e HB, mostrando uma relação de resposta diretamente proporcional à dose, o que é confirmado pelas retas ascendentes obtidas nas regressões lineares de ambos os cruzamentos.

As frequências de distribuição dos tamanhos de manchas mutantes (número células mutantes/mancha) observadas na análise dos descendentes MH, provenientes dos cruzamentos ST (**A**) e HB (**B**), dos grupos controle negativo (água destilada estéril), controle positivo (URE 0,891mg/mL) e grupos

tratados, são apresentadas na **Figura 3.3**, para as diferentes concentrações de WIN isoladamente, e na **Figura 3.4**, para as diferentes concentrações de WIN associadas ao URE, com predominância de manchas com apenas uma célula mutante, e um decréscimo gradual, de acordo com o aumento do tamanho das manchas, para todos os tratados com as diferentes concentrações de WIN isoladamente ou associadas ao URE.

Com relação à distribuição no tamanho de manchas mutantes, foi verificado que os indivíduos MH, de todas as séries analisadas (tratados e controles), apresentam uma predominância de manchas pequenas, sobre manchas grandes. Estes resultados estão de acordo com Graf *et al.* (1984) e Spanó *et al.* (2001), que descreveram que um tratamento de 48h implica na predominância de manchas pequenas de uma célula, sobre as demais manchas.

A ação inibitória do WIN sobre a atividade genotóxica do uretano, relacionada à sua interação com o sistema enzimático citocromo P450, pode ser um indício da ação epigenética dos esteróides e seus derivados sintéticos na carcinogênese, uma vez que a utilização da testosterona e seus derivados estão relacionados à indução de carcinomas em diferentes organismos (Sanofi-Synthelabo, 1999). A interação do WIN com o complexo citocromo P450 inibiria essas enzimas de atuarem no metabolismo de agentes xenobióticos carcinogênicos, impedindo o metabolismo, desativação e eliminação, causando, desta forma, danos celulares graves e irreversíveis ao organismo.

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o WIN, não apresenta efeitos genotóxicos, mas efeitos inibidores contra a ação genotóxica do URE, em células de asas de *D. melanogaster*. A proteção do WIN deve ser devida, provavelmente, por inibição do sistema enzimático citocromo P450. No entanto, estudos complementares devem ser realizados para uma melhor elucidação da atividade biológica dos agentes xenobióticos EAA nos diferentes organismos.

Referências Bibliográficas

- Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383-386.
- Abraham SK, Graf U. 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. *Food Chem Toxicol* 34:1-14.
- Anthony PP. 1988. Liver tumours. *Baillieres Clin Gastroenterol* 2:501-522.
- Bosland MC. 2006. Sex steroids and prostate carcinogenesis: integrated, multifactorial working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1089:168-176.
- Carrasco D, Prieto M, Pallardó L, Moll JL, Cruz JM, Berenguer J. 1985. Multiple hepatic adenomas after long-term therapy with testosterone ananthatate – Review of the literature. *J Hepatol* 1:573-578.
- Chafson A, Aucalir K. 2006. Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst* 2:462-469.
- Dogan EE, Yesilada E, Ozata L, Yologlu S. 2005. Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. *Drug Chem Toxicol* 28:289-301.
- Frei H and Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.
- Frei H and Würigler FE. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Froehner M, Fischer R, Leike S, Hakenberg OW, Noack B, Wirth MP. 1999. Intratesticular leiomyosarcoma in a young man after high dose doping with Oral-Turinabol: a case report. *Cancer* 86:1571-1575.
- Frölich A, Würigler FE. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 216:179-187.
- Frölich A, Würigler FE. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244:201-208.

- Giannitrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'Alessandro N, Montalto G. 2006. Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann N Y Acad Sci* 1089:228-236.
- Gorayski PM, Thomas AC, Thompson CH, Subhash HS. 2007. Hepatocellular carcinoma associated with recreational anabolic steroid use. *Br J Sports Med*, [Epub ahead of print], *Disponível on-line*: <http://bjsm.bmj.com/cgi/rapidpdf/bjsm.2007.039321v2>. Acesso em 28 jul 2007.
- Graf U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51:168-173.
- Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.
- Graf U, Spanó MA, Gusmán-Rincón J, Abraham SK and Andrade HHR. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newslett Occup Health Safety* 6:9-13.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Graf U, Frei H, Kâgi A, Katz AJ and Würgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222,359-373.
- Gusmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *In*: Butterworth FM *et al.* (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes*. Plenum Press, New York, 169-181.
- Iriart JAB, Andrade TM. 2002. Musculação. Uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública* 18:1379-1387.

- Katz AJ, Foley TA. 1993. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila melanogaster* wing-spot assay. Environ Mol Mutagen 22:54-58.
- Lang R, Redmann U. 1979. Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test. Mutat Res 67:361-365.
- Lang R, Reimann R. 1993. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames *Salmonella*/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. Environ Mol Mutagen 21:272-304.
- Manetta MCP, Silveira DX. 2000. Uso abusivo de esteróides anabolizantes androgênicos. Psiquiatria na Prática Médica 33(4). Disponível *on-line*: http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/atu1_04.htm. Acesso em 20 jul 2007.
- Meyer UA. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. J Pharmacokinet Biopharm 24:449-459.
- Motran DR, George AJ. 2000. Anabolic steroids. Baillieres Clin Endocrinol Metab 14:55-69.
- Nakajin S, Takahashi K, Shinoda M. 1989. Inhibitory effect and interaction of stanozolol with pig testicular cytochrome P-450 (17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase). Chem Pharm Bull 37:1855-1858.
- Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. P450 genes, structure, evolution and regulation. Ann Rev Biochem 56:945-993.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. Xenobiotica 19:1149-1160.
- Oshima-Franco Y, Franco LM. 2003. Biotransformação: importância e toxicidade. Saúde Rev 5:69-76.
- Reimann R, Kalweit S, Lang R. 1996. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex hormones. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. Environ Mol Mutagen 28:133-144.

- Rendic S, Ruf HH. 1988. Interaction of stanozolol with cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 37:766-768.
- Ricke WA, Ishii K, Ricke EA, Simko J, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR. 2006. Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis. *Int J Cancer* 118:2123-2131.
- Sanofi-Synthelabo. 1999. Prescribing information (Winstrol®, stanozolol). *Disponível on-line:* http://www.sanofisynthelabous.com/products/pi_winstrol/pi_winstrol.html. Acesso em: 26 mar 2003.
- Santos AF, Mendonça PMH, Santos LA, Silva NF, Tavares JKL. 2006. Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (SE). *Psicologia em Estudo* 11:371-380.
- Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. 2002. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte* 8:235-243.
- Socas L, Zumbado M, Pérez-Luzardo O, Ramos A, Pérez C, Hernández JR, Boada LD. 2005. Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br J Sports Med* 39. *Disponível on-line:* <http://bjsm.bmj.com/cgi/reprint/39/5/e27>. Acesso em 27 jul 2007.
- Spanó MA, Frei H, Würzler FE and Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16:385-394.
- Taylor W. 1987. Risk factors associated with the use of sex hormones. *Anticancer Res* 7:943-948.
- Tricker R, O'Neill MR, Cook D. 1989. The incidence of anabolic steroid use among competitive bodybuilders. *Journal of Drug Education* 19:313-325.

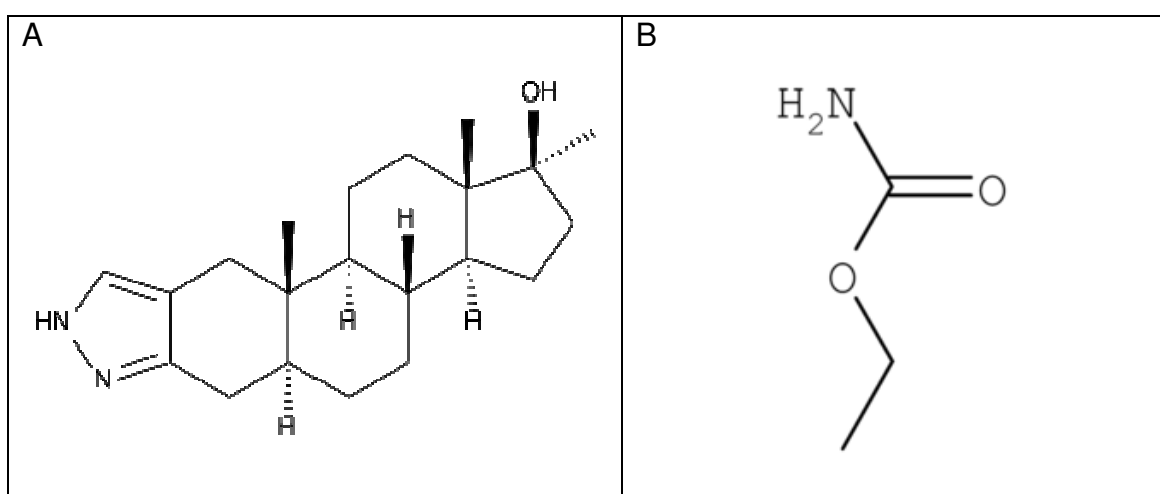


Figura 3.1 - Fórmulas estruturais dos compostos: **A** – Winstrol Depot® (WIN), estanozolol (Disponível *on-line*: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Estanozolol>. Acesso em 03 outubro 2007); **B** – Etilcarbamato (uretano – URE) (Disponível *on-line*: <http://es.wikipedia.org/wiki/Uretano>. Acesso em 03 outubro 2007).

Tabela 3.1 - Frequências de manchas mutantes simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG) e gêmeas (MG) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), obtidas por meio do teste de mutação e recombinação somática, após tratamento crônico ($\approx$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante estanozolol (WIN), isoladamente, e associado ao uretano (URE) 10Mm, e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

Tratamento		Nº de moscas (n)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a										Total de manchas mwh ^c	Inibição ^d (%)		
Concentrações WIN mg/mL	URE mg/mL		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m = 2			Manchas simples gêmeas (>2 céls) ^b m = 5			Manchas gêmeas m = 5			Total de manchas m = 2				
0	0	54	0,28	(15)		0,04	(02)		0,06	(03)		0,37	(20)	20		
0,625	0	61	0,30	(18)	i	0,07	(04)	i	0,03	(02)	i	0,39	(24)	-	24	
1,25	0	55	0,36	(20)	i	0,07	(04)	i	0,05	(03)	i	0,49	(27)	i	27	
2,5	0	60	0,27	(16)	-	0,07	(04)	i	0,05	(03)	i	0,38	(23)	-	23	
0	0,891	50	1,32	(66)	+	0,12	(06)	i	0,04	(02)	i	1,48	(74)	+	74	
0,625	0,891	50	0,90	(45)	+	0,06	(03)	i	0,06	(03)	i	1,02	(51)	f+	51	31,1
1,25	0,891	50	0,74	(37)	+	0,04	(02)	i	0,04	(02)	i	0,82	(41)	+	41	44,6
2,5	0,891	50	0,52	(26)	+	0,06	(03)	i	0,04	(02)	i	0,62	(31)	+	31	58,1

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples flr³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dCalculado por [URE isolado – URE + WIN) / URE isolado] X 100, de acordo com Abraham (1994).

Tabela 3.2 - Frequências de manchas mutantes simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG) e gêmeas (MG) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste de mutação e recombinação somática, após tratamento crônico ($\approx$ 48h) com diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) do anabolizante estanozolol (WIN), isoladamente, e associado ao uretano (URE) 10Mm, e seus respectivos controles negativo (água destilada estéril) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

Tratamento		Nº de moscas (<i>n</i>)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a										Total de manchas mwh ^c	Inibição ^d (%)		
Concentrações WIN mg/mL	URE mg/mL		Manchas pequenas siples (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2			Manchas grandes simples (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5			Manchas gêmeas <i>m</i> = 5			Total de manchas <i>m</i> = 2				
0	0	60	0,50	(30)		0,03	(02)		0,07	(04)		0,60	(36)	36		
0,625	0	58	0,34	(20)	-	0,07	(04)	I	0,02	(01)	-	0,43	(25)	-	25	
1,25	0	64	0,34	(22)	-	0,05	(03)	I	0,00	(00)	-	0,39	(25)	-	25	
2,5	0	60	0,32	(19)	-	0,07	(04)	I	0,07	(04)	i	0,45	(27)	-	27	
0	0,891	50	5,34	(267)	+	0,88	(44)	+	0,76	(38)	+	6,98	(349)	+	344	
0,625	0,891	50	4,56	(228)	f+	0,30	(15)	+	0,16	(08)	+	5,62	(281)	f+	251	19,5
1,25	0,891	50	2,98	(149)	+	0,14	(07)	+	0,14	(07)	+	3,26	(163)	+	163	53,3
2,5	0,891	56	1,52	(85)	+	0,11	(06)	+	0,04	(02)	+	1,66	(93)	+	93	76,2

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples flr³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dCalculado por [URE isolado – URE + WIN] / URE isolado] X 100, de acordo com Abraham (1994).

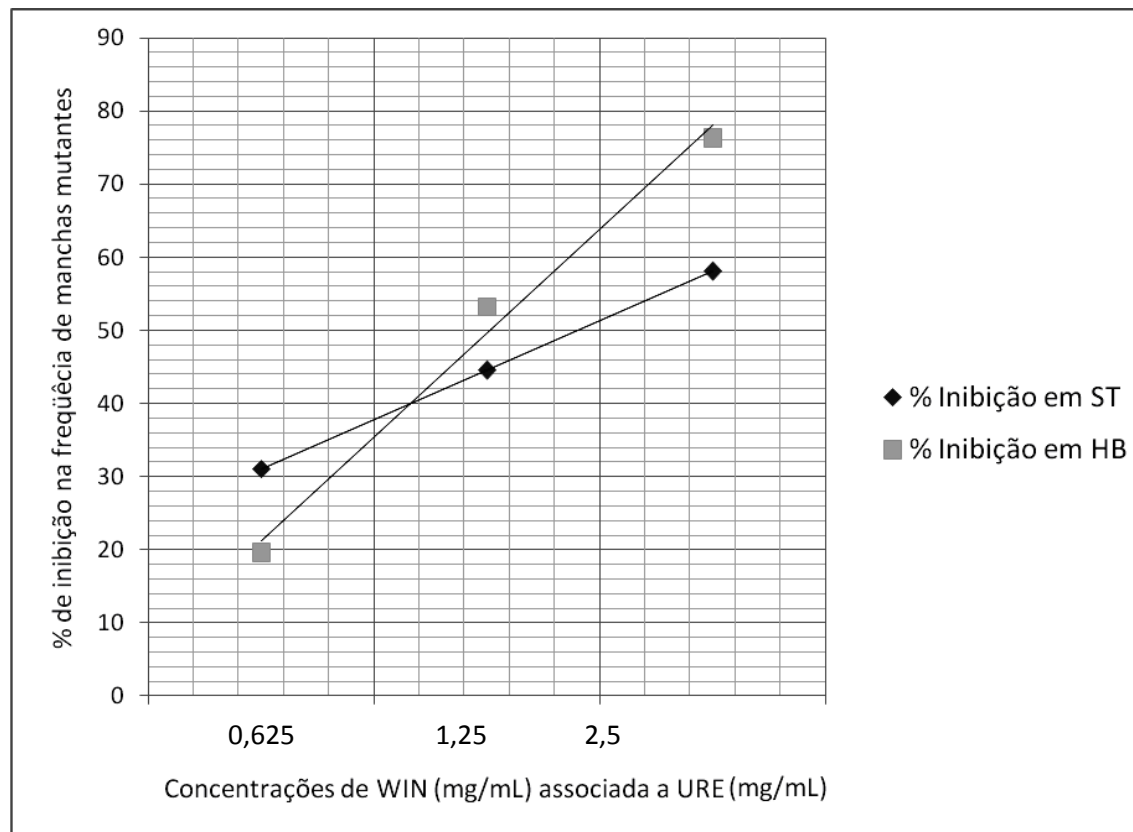


Figura 3.2. Regressão linear obtida pela correlação direta de dose dependência no percentual de inibição pelas diferentes concentrações (0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL) de estanozolol (WIN) nas frequências totais de manchas mutantes por indivíduos, induzidas pelo uretano (URE 0,891 mg/mL) em células de asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de ativação metabólica (HB) em co-tratamentos de aproximadamente 48 horas.

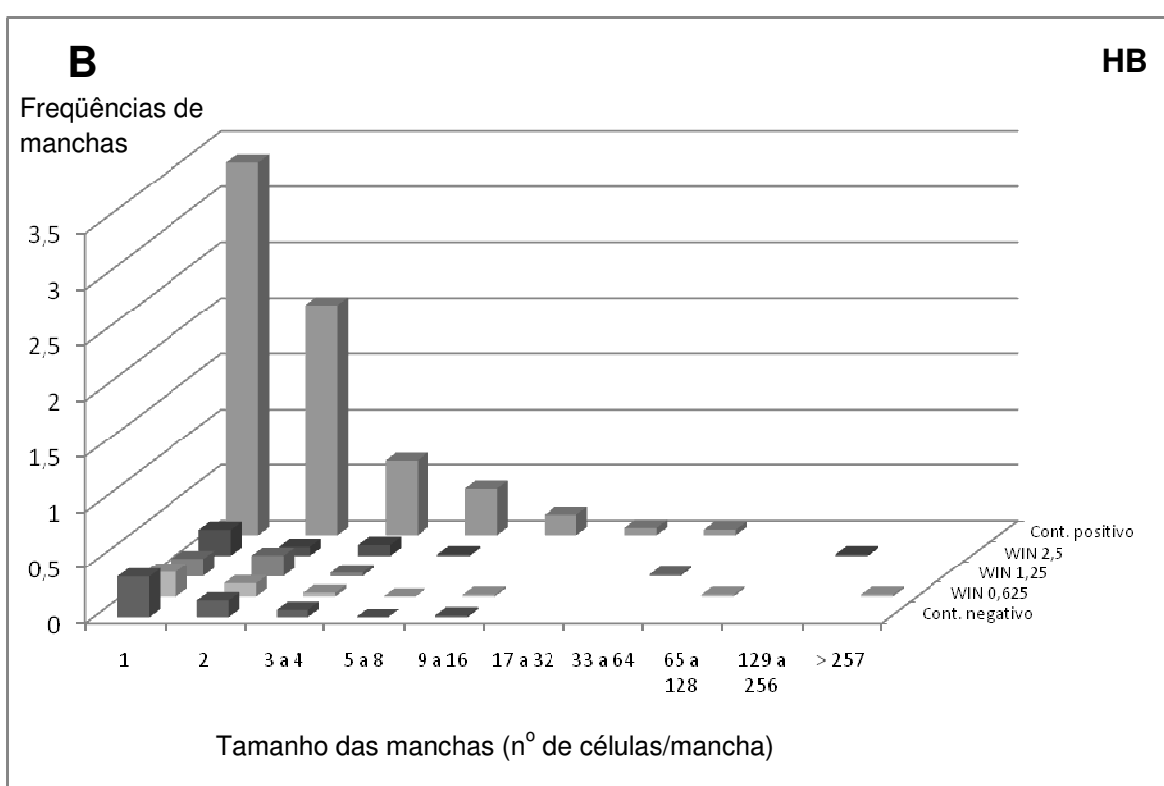
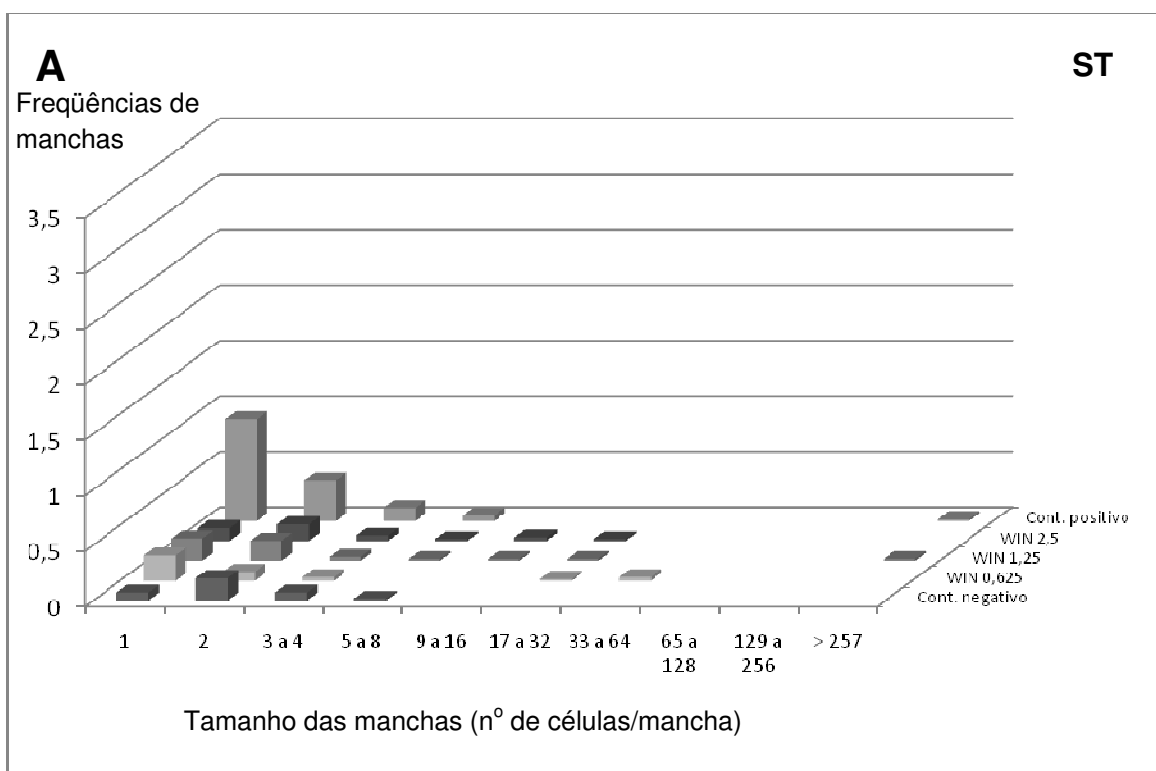


Figura 3.3 - Distribuição das frequências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Winstrol® (WIN) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril).

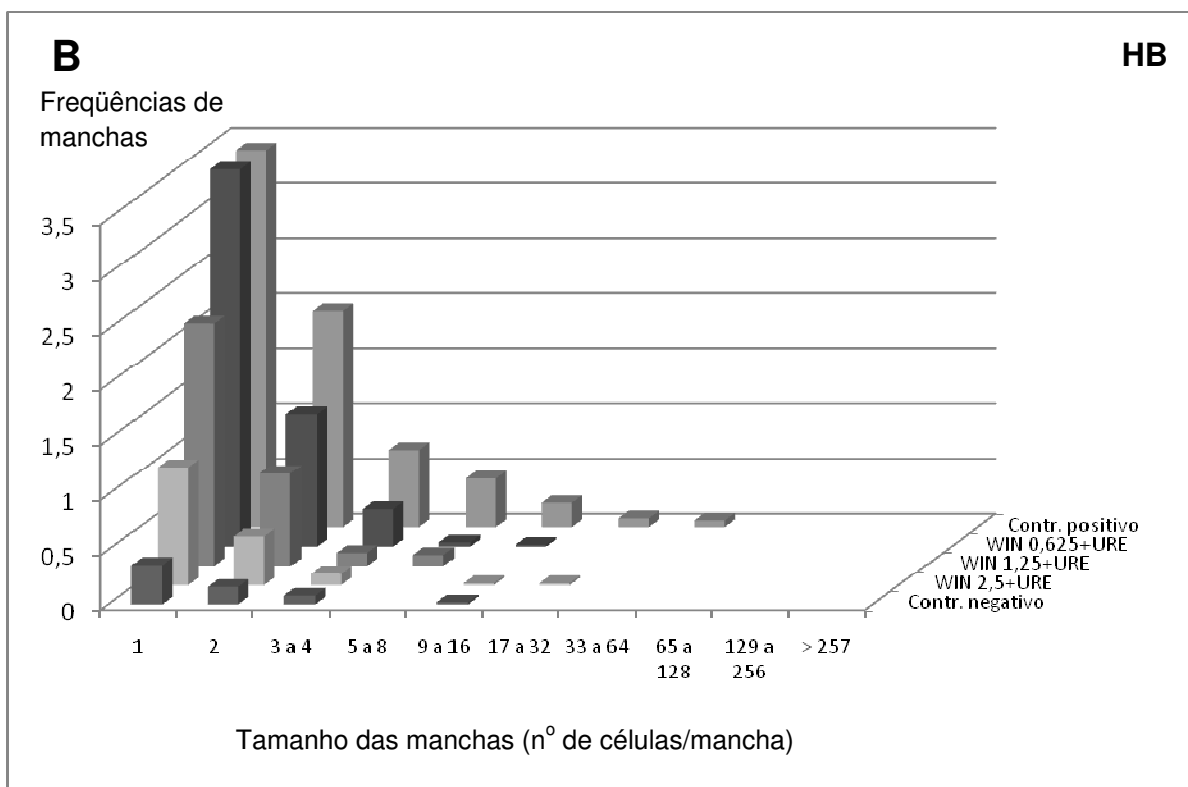
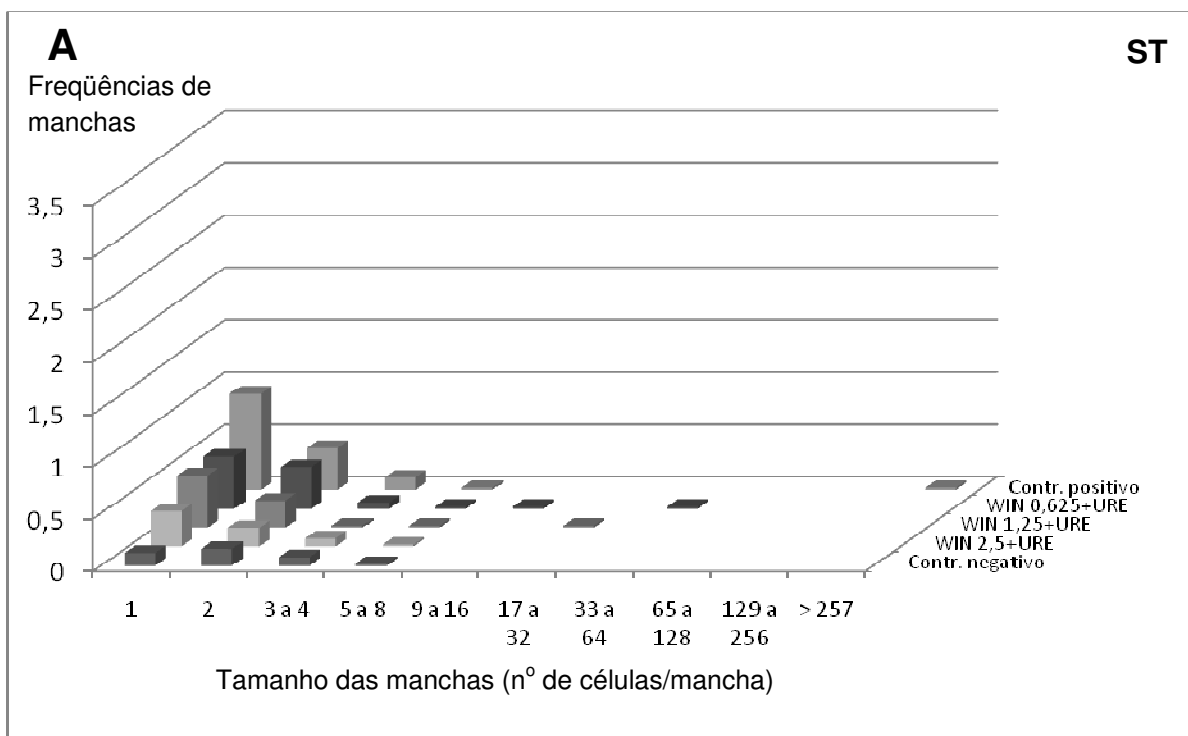


Figura 3.4 - Distribuição das freqüências de manchas por classes (número de células/mancha) observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos: **A** - padrão (ST) e **B** - de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), obtidas por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, tratadas com as diferentes concentrações de Winstrol® (WIN) (0,625; 1,25 e 2,5mg/mL) associado a uretano (URE) (0,891 mg/mL) e seus respectivos controles positivo (URE 0,891 mg/mL) e negativo (água destilada estéril).