



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
MESTRADO ACADÊMICO

Jeanderson Pereira Souza

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E
NECROSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE
ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**

Feira de Santana
2013

JEANDERSON PEREIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E
NECROSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE
ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**

Dissertação apresentada à banca examinadora como requisito final para aprovação no exame de Defesa do Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana- PPGSC/UEFS, na Área de Concentração de Epidemiologia e na Linha de Pesquisa Saúde de Grupos Populacionais Específicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Feira de Santana

2013

Ficha Catalográfica
Biblioteca Central Julieta Carteado

S715a Souza, Jeanderson Pereira.
Avaliação da ocorrência de danos cromossômicos, apoptose e necrose em células
esfoliadas da mucosa oral de usuários de esteróides anabolizantes androgênicos/
Jeanderson Pereira Souza.- Feira de Santana: 2013.
52f.: il.

Orientadora: Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa
de Pós- Graduação em Saúde Coletiva.

1. Esteróides anabolizantes. 2. Genotoxicidade. 3. Micronúcleo. 4. Apoptose.
I. Universidade Estadual de Feira de Santana. II. Programa de Pós- Graduação em
Saúde Coletiva III. Título.

CDU 616.31:547.92

Jeanderson Pereira Souza

**AVALIAÇÃO DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E NECROSE EM
CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE ESTERÓIDES
ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**

Data de defesa: 25 de março de 2012.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira (UEFS)

Profa. Dra. Susie Vieira de Oliveira (UEFS)

Profa. Dra. Nora Ney Alves Santos (UFBA)

À minha família (em especial a minha avô, Antônia Guimarães da Silva) e aos amigos que cruzaram em minha vida, participando de alguma forma na construção e realização deste trabalho. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a todos vocês, a minha imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora, a Prof^a Dr^a Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira, que sempre esteve disponível para orientações e consultas, assim como ensinamentos e sugestões que foram fundamentais em toda a pesquisa, principalmente para que esta dissertação pudesse ter sido concluída;

- Aos pesquisadores (pesquisadores, graduandos e pós-graduandos) do LABGENTOX, que me receberam no laboratório de maneira cordial e colaboraram sempre que preciso;

- A todas as pessoas que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa;

- E a outros colaboradores que, gentilmente, intermediaram o diálogo com os voluntários desta pesquisa.

“Os mais notáveis vencedores normalmente encontraram obstáculos dolorosos antes de triunfar. Venceram porque se negaram a serem desencorajados por suas derrotas.”

B.C.Forbes

APRESENTAÇÃO

A relação entre o uso de esteróides anabólicos androgênicos e a ocorrência de danos genéticos, assim como a inibição do mecanismo de apoptose e a indução de efeitos citotóxicos (necrose), vem sendo alvo de estudos nos últimos anos, e tem despertado o interesse da comunidade científica pelo tema, uma vez que estas alterações têm relação direta com o desenvolvimento do câncer. Na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), investigações nessa linha de pesquisa têm sido desenvolvidas por discentes da graduação e da pós-graduação sob a orientação de pesquisadores do Laboratório de Genética Toxicológica – LABGENTOX.

De um modo geral, tem sido crescente na literatura médica o relato da ocorrência de tipos de câncer relacionados ao uso dos EAA. Contudo, achados que versam sobre a relação entre estes hormônios e as alterações, citadas anteriormente, ainda se mostram contraditórios, sinalizando para a necessidade da realização de novos estudos assim como o aperfeiçoamento do método de pesquisa. A presente dissertação intitulada “AVALIAÇÃO DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS”, de autoria do mestrando Jeanderson Pereira Souza, é um dos produtos de um projeto de pesquisa desenvolvido no LABGENTOX e tem por objetivo avaliar através de um estudo de corte transversal, as frequências de alterações citológicas, indicativas de danos cromossômicos, apoptose e necrose, em não usuários e usuários de esteróides anabolizantes androgênicos.

O formato de apresentação deste exemplar de dissertação contempla um artigo científico, sob o título: AVALIAÇÃO DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS, apresentado no capítulo de Resultados, de acordo com os critérios do periódico *Medicine and Science in sports and Exercise*, segundo a classificação de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, como periódico *Qualis A1* em Saúde Coletiva.

RESUMO

A exposição a agentes genotóxicos induz alterações na molécula do DNA que ao comprometerem genes envolvidos com os mecanismos de reparo e com o controle da proliferação e diferenciação celular ou genes associados às vias de apoptose, podem levar ao desenvolvimento de câncer. Entre os muitos agentes químicos que têm sido identificados como de ação mutagênica, incluem-se os Esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA), hormônios amplamente utilizados na busca da melhoria do desempenho físico e aumento da massa muscular. **Objetivo:** Neste contexto, objetivou-se com o desenvolvimento do presente estudo, avaliar o potencial dos esteróides anabolizantes androgênicos **decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona** em induzir danos cromossômicos, apoptose e necrose, através do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de EAA com vista à sua aplicação como ferramenta na prevenção do câncer. **Método:** A amostra do estudo foi composta por 55 voluntários, do sexo masculino, distribuídos em dois (02) grupos, pareados por idade: 25 indivíduos (**G1**) usuários de **decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona** (isoladamente ou simultaneamente) e 30 indivíduos no grupo controle (**G2**). A metodologia de coleta e análise citológica seguiu o protocolo de Tolbert *et al.* (1992) e Thomas *et al.* (2009), que inclui, além de micronúcleos, o compute de alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e necrose (cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose). A análise estatística dos *endpoints* analisados (micronúcleo, cariorréxis, cromatina condensada, cariólise, picnose e *broken eggs*) foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros. **Resultados:** A análise estatística revelou que não houve diferença significativa na ocorrência de micronúcleo, cariólise e *broken eggs* entre os grupos. A ocorrência de apoptose foi, significativamente, maior em células dos indivíduos do grupo controle. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram inibição da apoptose induzida pelo uso de EAA, sugerindo que a associação descrita entre uso destas substâncias e o processo carcinogênico possa ser permeada por este mecanismo.

Palavras-chave: Esteróides anabolizantes, genotoxicidade, micronúcleo, apoptose.

ABSTRACT

Exposure to genotoxic agents induces changes in the DNA molecule to commit that genes involved with the repair mechanisms and the control of cell proliferation and differentiation pathways or genes associated with apoptosis can lead to cancer development. Among the many chemicals that have been identified as mutagenic action, include the Androgenic Steroids (AAS), hormones widely used in the search for improved physical performance and increased muscle mass. **Objective:** In this context, the aim of the development of this study was to evaluate the potential of androgenic anabolic steroid **nandrolone decanoate**, **testosterone propionate** and **testosterone cypionate** to induce chromosome damage, apoptosis and necrosis, using the micronucleus test in exfoliated cells from the oral mucosa of users of AAS with a view to its application as a tool in cancer prevention. **Method:** The study sample consisted of 55 volunteers, male, divided into two (02) groups, matched for age: 25 subjects (G1) users of **nandrolone decanoate**, **testosterone propionate** and **testosterone cypionate** (alone or simultaneously) and 30 subjects in the control group (G2). The collection methodology and cytological analysis followed the protocol of Tolbert et al. (1992) and Thomas et al. (2009), which includes, in addition to micronuclei, the computation of degenerative nuclear changes indicative of apoptosis (cariorréxis, condensed chromatin and pyknosis) and necrosis (karyolysis, cariorréxis, condensed chromatin and pyknosis). Statistical analysis of the endpoints analyzed (micronucleus, cariorréxis, condensed chromatin, karyolysis, pyknosis and broken eggs) was performed using the conditional test to compare proportions in situations of rare events. **Results:** Statistical analysis revealed no significant difference in the occurrence of micronuclei, karyolysis and broken eggs between groups. The occurrence of apoptosis was significantly greater in cells from control individuals. **Conclusion:** The results show inhibition of apoptosis induced by EAA, suggesting that the described association between the use of these substances and the carcinogenic process can be permeated by this mechanism.

Keywords: Anabolic steroids, genotoxicity, micronuclei, apoptosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
3 HIPOTHESES.....	14
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
5 METODOLOGIA.....	19
5.1 TIPO DE ESTUDO.....	19
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	19
5.3 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	20
5.4 ANÁLISE CITOLÓGICA.....	20
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	21
6 MODELO PREDITIVO.....	23
7 RESULTADOS.....	24
7.1 ARTIGO.....	25
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE A.....	51
APÊNDICE B.....	53

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado doença genética, uma vez que decorre de alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular (proto-oncogenes e supressores de tumor) e/ou em genes associados aos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores) ou com a apoptose, processo este responsável pela eliminação de células geneticamente alteradas cuja sobrevivência poderia resultar no desenvolvimento de um tumor (BIRCHALL *et al.* 1995; NIKITAKIS, 2004; GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008).

Assim, avaliar o potencial genotóxico de substâncias às quais estão expostas as populações humanas é imperativo para o controle dessa doença que, a despeito das medidas de prevenção já disponíveis, ocorre em frequências muito elevadas, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 2005a; TENTORI; GRAZIANI, 2007; SALAS-RAMIREZ *et al.*, 2008; SOUZA; FISBERG, 2009).

A crescente exposição humana a agentes capazes de induzir alterações no material genético, os denominados agentes mutagênicos, é consequência do desenvolvimento industrial e da adoção de alguns hábitos pelas sociedades modernas, a exemplo do consumo de tabaco, particularmente do cigarro industrializado, e, mais recentemente, do uso de esteróides anabolizantes androgênicos (EAA). A imagem de corpos inflados de músculos como modelo de corpo ideal e masculinidade, frequentemente exposta pelos meios de comunicação de massa, tem conduzido à valorização do corpo e contribuído para o aumento do número de adeptos ao uso de EAA (COURTINE, 1995; TENTORI; GRAZIANI, 2007).

Os EAA constituem um grupo de compostos sintéticos originados da testosterona e seus derivados esterificados ou alcalinizados (SOUZA; FISBERG, 2009). Apesar de promoverem o efeito desejado pelos usuários, isto é, aumento da massa muscular, uma variedade de efeitos colaterais tem sido a eles associada. Diversos estudos têm relatado associação positiva entre o consumo de EAA e alterações comportamentais (STEENSLAND *et al.*, 2005), dependência a outras drogas (CÉLÉRIER *et al.*, 2006) e diversas doenças, incluindo neoplasias de fígado, próstata e testículo (SILVA *et al.*, 2002; MARAVELIAS *et al.*, 2005; LILJEQVIST *et al.*, 2008).

O uso desses anabolizantes constitui, portanto, importante problema de Saúde Pública ora agravado pela disseminação entre jovens praticantes de atividade física o que anteriormente estava restrito a esportistas profissionais (IRVING *et al.*, 2002).

A associação entre uso de EAA e câncer que tem sido descrita em alguns estudos é

certamente o resultado do seu potencial genotóxico, já evidenciado em modelo animais e em pesquisas realizadas com humanos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SERAJ *et al.*, 1996; MARTELI *et al.*, 2003; MATTIOLI *et al.*, 2004; NANTERMET *et al.* 2004).

A avaliação da ocorrência de danos genéticos com vistas ao biomonitoramento de populações representa um primeiro passo na prevenção do câncer e as metodologias empregadas com esta finalidade devem, além de expressar resultados fidedignos, ser realizadas a baixo custo. Neste contexto, o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, particularmente quando empregado de acordo com o protocolo de Tolbert, Shy e Allen (1992) e Thomas *et al.* (2009), que detecta tanto danos cromossômicos quanto apoptose e necrose, tem sido apontado em diversos estudos como efetivo biomarcador de risco de câncer (SAILAJA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; BLOCHING *et al.*, 2008).

O registro na literatura dos efeitos genotóxicos do uso dos EAA identificados através do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas de usuários é, contudo, escasso. Em extensa revisão da literatura encontramos apenas dois estudos (TORRES-BUGÁRIN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010), além de uma avaliação preliminar por nós realizada (SOUZA, 2010). Assim, considerando a eficácia desse teste, a possível ação genotóxica dos EAA e o crescente uso destes produtos, objetiva-se com o desenvolvimento deste estudo avaliar: 1) a genotoxicidade e a citotoxicidade de três tipos de anabolizantes injetáveis, decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona e, 2) a eficácia do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas como ferramenta de prevenção de câncer. Respondendo, portanto à questão: “o uso de EAA está associado a um maior risco de desenvolvimento de câncer”?

2 OBJETIVO

2.1 Geral:

Identificar efeitos genotóxicos e citotóxicos dos esteróides anabolizantes androgênicos decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona através do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral.

2.2 Específicos

1. Avaliar a ocorrência de danos cromossômicos, expressos pelo compute de micronúcleos, em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona;
2. Investigar a ocorrência de alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose e necrose em células esfoliadas da mucosa oral de indivíduos que fazem uso dos anabolizantes decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona;
3. Avaliar a eficácia do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral como ferramenta no biomonitoramento de usuários de esteroides anabolizantes androgênicos.

3 HIPÓTESES DO ESTUDO

H_0 : A ocorrência de danos genotóxicos e citotóxicos é semelhante entre os usuários e não usuários de hormônios esteróides anabólico-androgênicos

.

H_1 : A ocorrência de danos genotóxicos e citotóxicos é maior entre os usuários de hormônios esteróides anabólico-androgênicos do que entre os não usuários.

4 REVISÃO DA LITERATURA

O principal esteróide androgênico é a testosterona, classificado como esteróide anabolizante ou esteróide anabólico-androgênico. Os esteróides anabolizantes, entre outros efeitos, promovem o aumento da massa e tônus muscular (MARQUES *et al.*, 2003; GHORBANIHAGHJO *et al.*, 2005).

Segundo Guerra *et al.* (2005), o decanoato de nandrolona, o propionato de testosterona e o cipionato de testosterona são os EAA mais utilizados por praticantes de atividades físicas.

O propionato de testosterona combina a ação de quatro compostos derivados da testosterona: propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona. É usado para reposição de testosterona em distúrbios específicos (VALADARES, 2007).

O EAA decanoato de nandrolona é, segundo Valadares (2007), um dos anabolizantes mais utilizados entre os atletas e indicado como coadjuvante para terapias específicas (GHORBANIHAGHJO *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2006; VALADARES, 2007).

O cipionato de testosterona tem forte ação androgênica promovendo rápido ganho de força e volume muscular, mas podendo levar à ginecomastia e aumento da pressão arterial (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O uso da testosterona por atletas foi registrado, pela primeira vez, entre meados de 50 e 60, quando surge o termo *doping* olímpico (CHAVES *et al.*, 2006; SOUZA ; FISBERG, 2009). Atualmente, o uso de EAA não está mais restrito ao grupo dos atletas, sendo consumido, também, entre frequentadores de academias de musculação (GUERRA *et al.*, 2005b; SALAS-RAMIREZ *et al.*, 2008; SOUZA; FISBERG, 2009). Entretanto, segundo Iriart e Andrade (2002) e Souza e Fisberg (2009) é intenso e preocupante, também, o aumento na frequência do uso de EAA entre os adolescentes devido à imagem de corpos inflados de músculos como modelo de corpo ideal e masculinidade.

Devido à popularização dos EAA entre os atletas amadores e os praticantes de musculação, a maior incidência dos efeitos adversos não se restringe aos esportistas profissionais, podendo acometer populações mais jovens, haja vista o crescente uso destas substâncias entre os adolescentes (COURTINE, 1995; IRVING *et al.*, 2002; TENTORI; GRAZIANI, 2007).

Os efeitos colaterais dos EAA fazem com que seu uso seja visto como problema de saúde pública. Entre os efeitos indesejáveis incluem-se: alteração do metabolismo de

colesterol, alterações nos testes de função hepática, icterícia, tumores hepáticos e alterações dos níveis dos hormônios sexuais (SILVA *et al.*, 2002; GUERRA *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2006; FAR *et al.*, 2007). São relatadas, também, ocorrências de: depressão, mania, quadros esquizofreniformes, agressividade, suicídios, homicídios e maturação esquelética precoce com fechamento prematuro das epífises ósseas com baixa estatura e puberdade acelerada (IRIART; ANDRADE, 2002; SILVA *et al.*, 2002; VALADARES, 2007).

Dentre os diversos efeitos indesejados associados ao uso de EAA, o risco de ocorrência de câncer entre usuários tem sido relatado. Silva *et al.* (2002) destacam a ocorrência de câncer de próstata, mas a ação destas substâncias na iniciação e desenvolvimento da doença não é clara, uma vez que o número de estudos para avaliar a genotoxicidade e/ou carcinogenicidade dos EAA é pequeno (JOOSTEN *et al.*, 2004). Alguns autores destacam, no entanto, alterações genéticas que corroboram a possível atividade genotóxica e/ou carcinogênica dos EAA.

Mattioli *et al.* (2004) avaliaram, utilizando o Ensaio Cometa, a genotoxicidade dos anabolizantes e demonstraram que o nível de fragmentação do DNA foi significativamente maior nas células expostas em comparação com as culturas controle.

O potencial carcinogênico de hormônios esteróides foi sugerido por Seraj *et al.* (1996). Este grupo de pesquisadores mostrou em cultura de células de fígado humano que diversos hormônios esteróides formam ligações covalentes com o DNA, podendo ocasionar mutações.

Shirai *et al.* (2000) relatam que em roedores a aplicação de testosterona isoladamente pode induzir o surgimento de câncer de próstata. Nantermet *et al.* (2004) sugerem que, em ratos, os esteróides causam decréscimo no nível da p53 em células da próstata, o que pode estar associado ao surgimento de tumor maligno porque as células alteradas podem não ser eliminadas via apoptose.

Os efeitos genotóxicos dos EAA foram também avaliados por Martelli *et al.* (2003). Estes autores analisaram a ação destas substâncias sob o sistema de reparo do DNA em hepatócitos *in vitro* de ratos e humanos. Em concentração de 50µM de testosterona, ao contrário do observado em células humanas, não foi identificada indução de reparo em hepatócitos de ratos.

Dhillon *et al.* (1995) avaliaram em cultura de linfócitos humanos, utilizando os ensaios de Troca de Cromátides Irmãs e Micronúcleo, a genotoxicidade da fluoxymesterona e concluíram que este esteróide apresenta ação clastogênica.

A despeito destes estudos nos quais pesquisadores associaram positivamente danos genéticos à exposição a esteróides androgênicos, outros autores não relataram tal associação (REIMANN; KALWEIT; LANG, 1996; HOLDEN; STUDWELL; MAJESKA, 1999).

A avaliação dos efeitos genotóxicos dos esteróides anabolizantes androgênicos tem sido também realizada com o uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral de usuários. Micronúcleos são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que durante a divisão celular falham em sua ligação ao fuso e, assim, não são incluídos no núcleo das células filhas permanecendo no citoplasma das células interfásicas onde são visualizados como estruturas similares ao núcleo, mas medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho deste (HOLLAND *et al.*, 2008).

A avaliação da ocorrência de danos genéticos, feita com o uso deste teste apresenta inúmeras vantagens, entre as quais se incluem: 1) o baixo custo, 2) fácil acesso ao material para estudo, 3) simplicidade da análise e 4) a detecção dos efeitos tanto de agentes aneugênicos quanto de agentes clastogênicos (RIBEIRO *et al.*, 2003). A sensibilidade do teste é ainda maior quando aplicado segundo o protocolo proposto por Tolbert; Shy e Allen (1991; 1992) e Thomas *et al.* (2009) no qual, além de micronúcleos são computadas alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e de necrose (ocorrência de cariólise adicionalmente a estas alterações).

A eficácia do Teste de Micronúcleo tem amplo registro na literatura (FREITA *et al.*, 2005; HEEPCCHANTREE; PARATASILPIN; KANGWANPONG, 2005; SAILAJA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008; BLOCHING *et al.*, 2008) e o seu modelo de protocolo está padronizado pelas diretrizes regulatórias internacionais (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Fazendo uso dessa metodologia, Martins *et al.* (2010), em estudo do tipo caso-controle, avaliaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos dos anabolizantes decadurabolin e winstrol em 15 indivíduos que praticavam levantamento de peso e eram usuários dessas drogas. O grupo controle incluiu vinte indivíduos sedentários não-usuários de anabolizantes androgênicos. A ocorrência de micronúcleos, cariólise, cariorréxis e picnose foi significativamente maior entre os usuários, apontando para o potencial desses anabolizantes em induzir genotoxicidade e citotoxicidade. Adicionalmente os autores compararam a ocorrência desses *endpoints* entre os indivíduos do grupo controle e 15 indivíduos que praticavam levantamento de peso e que não eram usuários de anabolizantes. Diferenças estatisticamente significantes não foram observadas.

Maior ocorrência de micronúcleos (MN) em células esfoliadas do epitélio oral em consequência do uso de esteróides anabolizantes androgênicos foi também observada por

Torres-Bugárin et al. (2007) em estudo que incluiu 11 fisiculturistas, cinco dos quais eram usuários dessas drogas.

Em estudo preliminar a este, Souza (2010) analisou a ocorrência de alterações genéticas em função do uso de esteróides anabolizantes, comparando 20 indivíduos do grupo controle e 20 usuários de EAA que faziam uso, simultâneo ou exclusivo, dos derivados sintéticos decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona. Os resultados obtidos demonstraram uma frequência de MN significativamente maior nas células de usuários que faziam uso simultâneo das três marcas, sugerindo uma ação sinérgica das formulações avaliadas na promoção de danos genéticos. Segundo Mcardle, Katch e Katch (1992), o uso combinado de formulações para compor os ciclos de administração dos EAA potencializa os efeitos colaterais da droga.

Ainda segundo os resultados de Souza (2010), a ocorrência de apoptose, inferida de acordo com o protocolo sugerido por Tolbert, Shy e Allen (1992), diferiu entre controle e usuários, apresentando significativamente menor frequência de apoptose no segundo grupo, sugerindo que os EAA interferem em vias de inibição apoptótica. Tentori e Graziani (2007) observaram que os hormônios androgênicos podem inibir a resposta celular ao estímulo de apoptose. Efeitos similares foram descritos por Niu *et al.* (2001) em células da próstata.

Esses achados sugerem que importantes medidas preventivas devem ser tomadas em relação à popularização e conseqüente utilização dos EAA, uma vez que estes são substâncias que podem levar a sérias implicações psíquicas e clínicas, entre elas, o câncer (SILVA *et al.*, 2002; IRIART; ANDRADE, 2002; GUERRA *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2006; FAR *et al.*, 2007; VALADARES, 2007).

Dentre essas medidas de prevenção, a identificação e a quantificação de alterações citogenéticas vêm sendo considerada uma importante estratégia, permitindo inferir risco aumentado de desenvolvimento do câncer antes que ocorram sintomas clínicos. A alta sensibilidade a danos cromossômicos apresentada pelo Teste de Micronúcleo e sua eficiência no biomonitoramento da exposição humana a agentes genotóxicos tem sido relatada em diversos estudos, uma vez que um aumento na frequência de micronúcleos precede as manifestações clínicas relacionadas ao desenvolvimento do câncer (TOLBERT *et al.*, 1992; MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; SALAMA *et al.*, 1999; CAVALLLO *et al.*, 2005).

5 METODOLOGIA

5.1. TIPO DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada através de um estudo individualizado e observacional de corte transversal passível de detectar uma possível associação simultânea entre o uso de anabolizantes e o risco de desenvolvimento de câncer mensurado pela quantificação e análise da frequência de indicadores de danos cromossômicos, apoptose e necrose. Segundo Rouquayrol e Almeida Filho (2003), este tipo de estudo se caracteriza por produzir “instantâneos” da situação de saúde de uma população com base na avaliação individual de cada um dos membros do grupo, e a partir disto, produzir indicadores globais de saúde para o grupo investigado.

Neste trabalho, o subtipo de corte transversal adotado foi o estudo em populações especiais e os resultados foram observados a partir dos sujeitos expostos ou não expostos ao uso de EAA evidenciando as suas características e correlações simultâneas com o risco de desenvolvimento de câncer sem que houvesse interferência do observador. Este desenho de pesquisa epidemiológica caracteriza-se pela observação direta de determinada quantidade de participantes (JEKEL *et al.*, 2005) na qual fator e efeito são observados em um mesmo momento histórico (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003) e os indivíduos são estudados em um ponto no tempo - corte transversal (FLETCHER *et al.*, 1996).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por cinquenta e cinco indivíduos do sexo masculino distribuídos em dois grupos pareados por idade: 25 indivíduos (**G1**) usuários de decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona (isoladamente ou simultaneamente) e 30 indivíduos no grupo controle (**G2**), selecionados em academias de ginástica de Feira de Santana.

Seguindo o modelo de Pavão *et al.* (2007), foi aplicado um questionário (apêndice I) a todos os indivíduos inquirindo sobre dados pessoais, estilo de vida, história médica (uso de medicamentos, exposição à genotóxicos) e protocolo do ciclo de esteróides.

5.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Foram coletadas, através de raspagem gentil, células da mucosa jugal utilizando escova endocervical. As células foram transferidas por esfregaço para lâmina de microscopia estéril contendo uma gota de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e secadas à temperatura ambiente. Após a secagem, o material foi fixado em solução de metanol/ácido acético (3:1) e após 24h foi corado com o reativo de *Shift* de acordo com o protocolo de Feülgen & Rossenbeck e contra-corado com *fast green* a 1% em etanol absoluto por 20 segundos.

5.4. ANÁLISE CITOLÓGICA

A análise citológica foi realizada através de microscopia óptica (200X) e em teste cego em relação aos dados do questionário. Foram analisadas um mínimo de 2.000 (duas mil) células por indivíduo. No presente estudo, foi adotado o protocolo diferenciado do Teste de Micronúcleo, sugerido por Tolbert *et al.* (1992) e Thomas *et al.* (2009), segundo o qual além de micronúcleos, são computadas células apresentando alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada, picnose) e necrose (cariólise, adicionalmente a estas alterações).

De acordo com estes protocolos:

a) são incluídas como normais apenas as células com núcleo normal e intacto e que apresentem o citoplasma, também, intacto, com exceção das células que possuam dobras ou sobreposição com as células adjacentes;

b) são considerados como micronúcleos apenas as estruturas de formato redondo ou oval menor/igual a 1/3 do tamanho do diâmetro do núcleo associado, intensidade da coloração com *Feulgen* semelhante ao núcleo e mesmo plano focal à microscopia e ausência de sobreposição ou pontes com o núcleo;

c) células apresentando cromatina condensada são aquelas que têm um padrão nuclear estriado em que a cromatina agregada tem coloração mais intensa que o restante do núcleo e está totalmente condensada;

d) são consideradas em cariorréxis as células nas quais forem observadas um padrão nuclear de fragmentação levando à desintegração do núcleo;

e) células picnóticas são caracterizadas por um núcleo pequeno, encolhido, com diâmetro igual a 1/3 ou 2/3 de um núcleo de uma célula normal;

f) são consideradas apresentando cariólise as células que não possuem DNA no seu núcleo, e conseqüentemente, sem coloração nuclear com *Feulgen*;

g) são considerados *broken eggs*, estruturas apresentando distribuição cromatínica semelhante ao núcleo, menores que este, e a ele ligadas por um fino filamento Feülgen positivo.

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Precedendo o tratamento estatístico, os dados obtidos com a aplicação dos questionários e análise citológica foram utilizados para criação de um banco de dados em Excel.

A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa aos parâmetros considerados foi realizada com os seguintes testes estatísticos:

1. Para análise das tabelas de associação empregou-se o Teste de Qui-quadrado
2. Para análise das variáveis quantitativas (idade) foi empregado o Teste t de Student
3. A avaliação dos *endpoints* citológicos foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991) que é um teste de significância alternativo ao de Qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer (KALBFLEISCH, 1979) e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada aberração cromossômica.

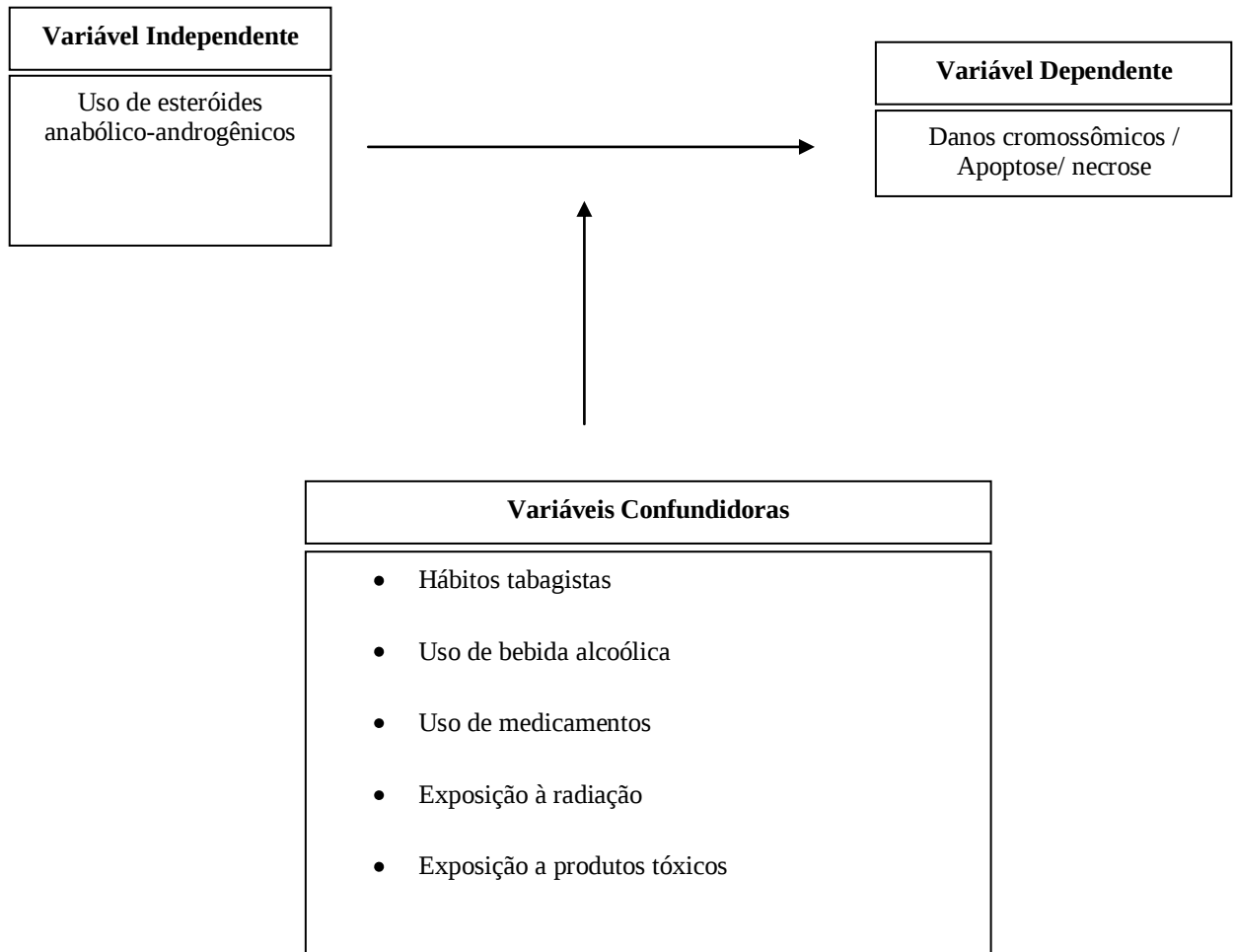
Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

5.6. ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa obedeceu à Resolução 196/96 e teve início após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo 100/2011). Todos os voluntários convidados a participarem do estudo foram esclarecidos a

respeito da pesquisa e tiveram total liberdade para não participar ou desistir no momento que lhes fossem convenientes. A confidencialidade dos dados foi assegurada a todos os participantes, os quais após estarem esclarecidos concordaram com a sua inclusão ao estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B).

6 MODELO PREDITIVO



7. RESULTADOS

Apresentados sob a forma de artigo científico redigido nas normas da *Medicine and science in sports and exercise*.

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE DANOS CROMOSSÔMICOS, APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL DE USUÁRIOS DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

Jeanderson Pereira Souza*, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira¹, José Roberto Cardoso Meireles¹

Toxicological Genetics Laboratory, Department of Biological Sciences, Feira de Santana State University

Autor para Correspondência: Jeanderson Pereira Souza – Rua A, Caminho 02, nº 25, Conjunto Feira VI, Bairro Campo Limpo. Feira de Santana, Bahia, Brasil. CEP: 44.034-205.

Telefone: 55 75 81021351; e-mail: jeanderson.ps@bol.com.br

Cabeçalho: **Esteróides anabolizantes androgênicos e genotoxicidade.**

RESUMO

Introdução: A exposição a agentes genotóxicos induz alterações na molécula do DNA que ao comprometerem genes envolvidos com os mecanismos de reparo e com o controle da proliferação e diferenciação celular ou genes associados às vias de apoptose, podem levar ao desenvolvimento de câncer. Entre os muitos agentes químicos que têm sido identificados como de ação mutagênica, incluem-se os Esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA), hormônios amplamente utilizados na busca da melhoria do desempenho físico e aumento da massa muscular. **Objetivo:** Neste contexto, objetivou-se com o desenvolvimento do presente estudo, avaliar o potencial dos esteróides anabolizantes androgênicos **decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona** em induzir danos cromossômicos, apoptose e necrose, através do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de EAA com vista à sua aplicação no biomonitoramento desses indivíduos. **Método:** A amostra foi composta por 55 indivíduos, do sexo masculino, distribuídos em dois (02) grupos, pareados por idade: 25 indivíduos (**G1**) usuários de **decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona** (isoladamente ou simultaneamente) e 30 indivíduos no grupo controle (**G2**). A metodologia de coleta e análise citológica seguiu o protocolo de Tolbert *et al.* (1992) e Thomas *et al.* (2009), que inclui, além de micronúcleos, o computo de *broken eggs* e de alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e necrose (cariólise, adicionalmente a estas alterações). A análise estatística dos *endpoints*

analisados foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros. **Resultados:** A análise estatística revelou que não houve diferença significativa na ocorrência de micronúcleos, cariólise e *broken eggs* entre os grupos. A ocorrência de apoptose foi, significativamente, maior em células dos indivíduos do grupo controle. **Conclusões:** Os resultados obtidos mostram inibição da apoptose induzida pelo uso de EAA, sugerindo que este, pode ser um dos mecanismos que contribuem para a associação descrita entre uso destas substâncias e o processo carcinogênico. **Palavras-chave:** Esteróides anabolizantes, micronúcleo, genotoxicidade, citotoxicidade, apoptose.

ABSTRACT

Introduction: Exposure to genotoxic agents induces changes in the DNA molecule to commit that genes involved with the repair mechanisms and the control of cell proliferation and differentiation pathways or genes associated with apoptosis can lead to cancer development. Among the many chemicals that have been identified as mutagenic action, include the Androgenic Steroids (AAS), hormones widely used in the search for improved physical performance and increased muscle mass. **Objective:** In this context, the aim of the development of this study was to evaluate the potential of anabolic androgenic steroid **nandrolone decanoate**, **testosterone propionate** and **testosterone cypionate** to induce chromosome damage, apoptosis and necrosis, using the micronucleus test in exfoliated cells from the oral mucosa of users of AAS with a view to its application in monitoring these individuals. **Method:** The sample consisted of 55 individuals, males, divided into two (02) groups, matched for age: 25 individuals (G1) users of **nandrolone decanoate**, **testosterone propionate** and **testosterone cypionate** (separately or simultaneously) and 30 individuals in the control group (G2). The methodology for collecting and cytological analysis followed the protocol of Tolbert et al. (1992) and Thomas et al. (2009), which includes, in addition to micronuclei, the computation of broken eggs and degenerative nuclear changes indicative of apoptosis (cariorréxis, condensed chromatin and pyknosis) and necrosis (karyolysis additionally these changes). Statistical analysis was performed endpoints analyzed using the conditional test to compare proportions in situations of rare events. **Results:** Statistical analysis revealed no significant difference in the incidence of micronuclei, karyolysis and broken eggs between groups. The occurrence of apoptosis was significantly higher in cells from control subjects. **Conclusions:** The results show inhibition of apoptosis induced by EAA, suggesting that this may be one of the mechanisms that contribute to the described association between the use of these substances and the carcinogenic process. **Keywords:** Anabolic steroids, micronucleus, genotoxicity, cytotoxicity, apoptosis.

O câncer é considerado doença genética, uma vez que decorre de alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular (proto-oncogenes e

supressores de tumor) e/ou em genes associados aos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores) ou à apoptose (1, 18, 42).

Assim, avaliar o potencial genotóxico de substâncias às quais estão expostas as populações humanas é imperativo para o controle dessa doença que, a despeito das medidas de prevenção já disponíveis, ocorre em frequências muito elevadas, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (19, 53, 60, 63).

A crescente exposição humana a agentes capazes de induzir alterações no material genético (agentes mutagênicos) é consequência do desenvolvimento industrial e da adoção de alguns hábitos pelas sociedades modernas, a exemplo, mais recentemente, do uso de esteróides anabolizantes androgênicos (EAA). A imagem de corpos inflados de músculos como modelo de corpo ideal e masculinidade, frequentemente exposta pelos meios de comunicação de massa, tem conduzido à valorização do corpo e contribuído para o aumento do número de adeptos ao uso de EAA (8, 63).

Os EAA constituem um grupo de compostos sintéticos originados da testosterona e seus derivados esterificados ou alcalinizados (60). Apesar de promoverem o efeito desejado pelos usuários, isto é, aumento da massa muscular, uma variedade de efeitos colaterais tem sido a eles atribuída. Diversos estudos têm relatado associação positiva entre o consumo de esteróides

anabolizantes androgênicos e alterações comportamentais (62), dependência a outras drogas (6) e diversas doenças, incluindo a ocorrência de neoplasias de fígado, próstata e testículo (32, 35, 58).

O uso desses anabolizantes constitui, portanto, importante problema de Saúde Pública, ora agravado pela disseminação acelerada entre jovens praticantes de atividade física, o que anteriormente estava restrito a esportistas profissionais (27).

A associação entre uso de EAA e câncer que tem sido descrita na literatura pode estar relacionada a um potencial genotóxico, como já evidenciado em estudos realizados em culturas de células *in vitro* (37,39,56) e *in vivo* (41).

A avaliação da ocorrência de danos genéticos com vistas ao biomonitoramento de populações representa um primeiro passo na prevenção do câncer e as metodologias empregadas com esta finalidade devem, além de expressar resultados fidedignos, ser realizadas a baixo custo. Neste contexto, o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, particularmente quando empregado de acordo com os protocolos de Tolbert *et al.* (66) e Thomas *et al.* (64), que detectam tanto danos cromossômicos quanto apoptose e necrose, tem sido apontado em diversos estudos como efetivo biomarcador de risco de câncer (2, 46, 51).

O registro na literatura dos efeitos genotóxicos do uso dos EAA identificados através do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas de usuários é, contudo, escasso. Em extensa revisão da literatura foram encontrados apenas dois estudos (38, 67), além de uma avaliação preliminar por nós realizada (61). Assim, considerando a eficácia desse teste, a possível ação genotóxica dos EAA e o crescente uso destes produtos, objetivou-se, com o desenvolvimento do presente estudo, avaliar: 1) a genotoxicidade e a citotoxicidade de três tipos de anabolizantes injetáveis, decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona e, 2) a eficácia do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas como ferramenta de biomonitoramento de usuários de EAA. Respondendo, portanto à questão: “o uso de EAA está associado a um maior risco de desenvolvimento de câncer”?

MÉTODOS

Trata-se de um estudo individualizado e observacional de corte transversal passível de detectar uma possível associação simultânea entre o uso de anabolizantes e o risco de desenvolvimento de câncer mensurado pela quantificação e análise da frequência de indicadores de genotoxicidade e citotoxicidade.

Este desenho de pesquisa epidemiológica caracteriza-se pela observação direta de determinada quantidade de participantes (28) na qual fator e efeito são observados em um mesmo momento histórico (50) e os indivíduos são estudados em um ponto no tempo - corte transversal (12), produzindo “instantâneos” da situação de saúde de uma população com base na avaliação individual de cada um dos membros do grupo, e a partir disto, produzir indicadores globais de saúde para o grupo investigado (50).

Amostra

A amostra foi constituída por cinquenta e cinco (55) indivíduos do sexo masculino distribuídos em dois grupos pareados por idade: 25 indivíduos (**G1**) usuários de decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona (consumidos isoladamente ou simultaneamente) e 30 indivíduos no grupo controle (**G2**), selecionados em academias de ginástica e de musculação de Feira de Santana – BA, Brasil.

Seguindo o modelo de Pavão *et al.* (45), foi aplicado um questionário a todos os indivíduos inquirindo sobre dados pessoais, estilo de vida, história médica (uso de medicamentos, exposição à genotóxicos) e protocolo do ciclo de uso dos esteróides anabolizantes.

Coleta e processamento do material

Foram coletadas, através de raspagem gentil, células da mucosa jugal utilizando escova endocervical. As células foram transferidas por esfregaço para lâmina de microscopia estéril contendo uma gota de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e secadas à temperatura ambiente. Após a secagem, o material foi fixado em solução de metanol/ácido acético (3:1) e após 24h foi corado com o reativo de *Shift* e contra-corado com *fast green* a 1% em etanol absoluto por 20 segundos.

Análise Citológica

A análise citológica foi realizada através de microscopia óptica (200X) e em teste cego em relação aos dados do questionário. Foi analisado um mínimo de 2.000 (duas mil) células por indivíduo. Foi adotado o protocolo diferenciado do Teste de Micronúcleo, sugerido por Tolbert *et al.* (66) e Thomas *et al.* (64), segundo o qual além de micronúcleos, são computadas células apresentando *broken eggs* e alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada, picnose) e necrose (cariólise, adicionalmente a estas alterações).

De acordo com estes protocolos:

a) são incluídas como normais apenas as células apresentando núcleo intacto com distribuição regular da cromatina e que apresentem o citoplasma, também, intacto, com exceção das células

que possuam dobras ou sobreposição com as células adjacentes;

b) são considerados micronúcleos as estruturas com formato redondo ou oval, apresentando em relação ao núcleo principal distribuição cromatínica e coloração similar (ou mais clara), observadas no mesmo plano, distintamente separadas dele e cujo tamanho não ultrapasse 1/3 do tamanho do núcleo.

c) células apresentando cromatina condensada são aquelas que têm um padrão nuclear estriado em que a cromatina agregada tem coloração mais intensa que o restante do núcleo e está totalmente condensada;

d) são consideradas em cariorréxis as células nas quais for observado um padrão nuclear de fragmentação levando à desintegração do núcleo;

e) células picnóticas são caracterizadas por um núcleo pequeno, encolhido, com diâmetro igual a 1/3 ou 2/3 de um núcleo de uma célula normal;

f) são consideradas apresentando cariólise as células que não possuem DNA no seu núcleo, e consequentemente, sem coloração nuclear com *Feulgen*;

g) são considerados *broken eggs*, estruturas apresentando distribuição cromatínica semelhante ao núcleo, menores que este, e a ele ligadas por um fino filamento Feülgen positivo.

Análise Estatística

Precedendo o tratamento estatístico, os dados obtidos com a aplicação dos questionários e análise citogenética foram utilizados para criação de um banco de dados em Excel. A avaliação das diferenças entre os grupos, relativa aos parâmetros considerados foi realizada com os seguintes testes estatísticos:

1. Para análise das tabelas de associação empregou-se o Teste de Qui-quadrado;

2. Para análise das variáveis quantitativas (idade) foi empregado o Teste t de Student;

3. A avaliação dos *endpoints* citológicos foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (3) que é um teste de significância alternativo ao de Qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer (31) e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada aberração cromossômica.

Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

Aspectos Éticos

A pesquisa obedeceu à Resolução 196/96 e teve início após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo 100/2011). Todos os voluntários convidados a participarem do estudo foram esclarecidos a respeito da pesquisa e tiveram total liberdade para não participar ou desistir no momento que lhes fossem convenientes. A confidencialidade dos dados foi assegurada a todos os participantes, os quais após estarem esclarecidos concordaram com a sua inclusão ao estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

Características da Amostra

A média de idade dos indivíduos que compuseram a amostra foi de $24,04 \pm 5,36$ no G1 e de $24,38 \pm 5,57$ no G2, não havendo diferença estatística ($p > 0,50$).

Com relação ao tabagismo e ao hábito de ingerir bebidas alcoólicas, em ambos os grupos, dois indivíduos informaram o hábito de fumar e todos relataram o hábito de ingerir bebida alcoólica. O hábito de consumo de bebida alcoólica regularmente (diário, semanal e mensal) foi informado por 15 participantes no G1 e por 14 no G2. No G1, 12 indivíduos relataram ingerir apenas cerveja, um consumia apenas vinho e 11 associavam cerveja e outro tipo de bebida alcoólica e um não informou o tipo de bebida alcoólica consumida. No G2, 17

peessoas consumiam apenas cerveja, duas ingeriam exclusivamente vinho, nove associavam cerveja e outras bebidas alcoólicas e duas não informaram o tipo de bebida alcoólica consumida.

Dez participantes do G2 e seis do G1 informaram exposição a agentes tóxicos (clorofórmio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido acético). Não foi detectada diferença entre os grupos em relação a este aspecto ($p>0,75$). Em ambos os grupos, os indivíduos expostos a estes agentes, relataram que a exposição ocorria de maneira esporádica. A **tabela 1** sumariza as características da amostra estudada.

A prática de exercício físico foi relatada por todos os voluntários, em ambos os grupos. No G1, dois indivíduos informaram praticar exercício físico há pelo menos um ano, 22 há mais de um ano e um participante não informou o tempo.

No G2, 11 indivíduos faziam exercício físico há pelo menos um ano e 19 voluntários reataram praticar estes exercícios há mais de um ano. No G1, 22 participantes praticavam exercícios físicos regularmente, e no G2, 27 praticavam exercícios regularmente. No G1, seis indivíduo associava atividade aeróbica e anaeróbica, enquanto no G2, sete participantes associavam atividade aeróbica e anaeróbica. A prática de exercício físico está apresentada na **tabela**

2.

Tabela 1 – Características da amostra

Grupo	G1	G2
Características		
Hábito de fumar		
Não fumantes	23	28
Fumantes	2	2
Hábito de beber		
Consumo		
Sim	25	30
Não	0	0
Frequência		
Regular	15	14
Irregular	10	16
Duração em anos		
Até 10	24	30
> 10	1	0
Exposição a agentes tóxicos		
Não-Expostos	19	20
Expostos	6	10

Tabela 2 – Prática de exercício físico

Grupo	G1	G2
Características		
Prática de Exercício Físico		
Sim	25	30
Não	0	0
Frequência		
Regular	22	27
Não regular	3	3
Tipo		
Aeróbico	19	23
Aeróbico + Anaeróbico	6	7
Tempo		
Até 1 ano	2	11
Mais de 1 ano	22	19
Não obtido	1	0

A frequência semanal de uso de EAA foi relatada por 12% dos indivíduos, 48% informaram fazer uso mensal, 36% utilizavam ocasionalmente e 4% não informaram a frequência de uso. Com relação ao tempo de uso, 64% usavam a

pelo menos um ano, 32% a mais de um ano e 4% não informaram (Tabela 3). Todos os indivíduos do G1 faziam uso dos anabolizantes por via intramuscular, dos quais, 20% usavam apenas propionato de testosterona, 12% injetavam apenas decanoato de nandrolona, 16% usavam apenas cipionato de testosterona, 8% associavam propionato de testosterona e decanoato de nandrolona, 8% associavam cipionato de testosterona e decanoato de nandrolona e 36% associavam propionato de testosterona, cipionato de testosterona e decanoato de nandrolona.

Tabela 3 – Características do uso de anabolizantes

Características	Grupo	G1
Frequência		
Semanal		3
Mensal		12
Ocasional		9
Não informado		1
Tempo		
Até 1 ano		16
Mais de 1 ano		8
Não informado		1

Avaliação Citológica

A Fig. 1 apresenta fotomicrografias de células observadas na análise citológica. Um total de 110.000 células foi analisado: 50.000 células no

grupo de usuários (G1) e 60.000 células no grupo controle (G2). A ocorrência das alterações analisadas estão apresentadas nas **Tabelas 4 e 5.**

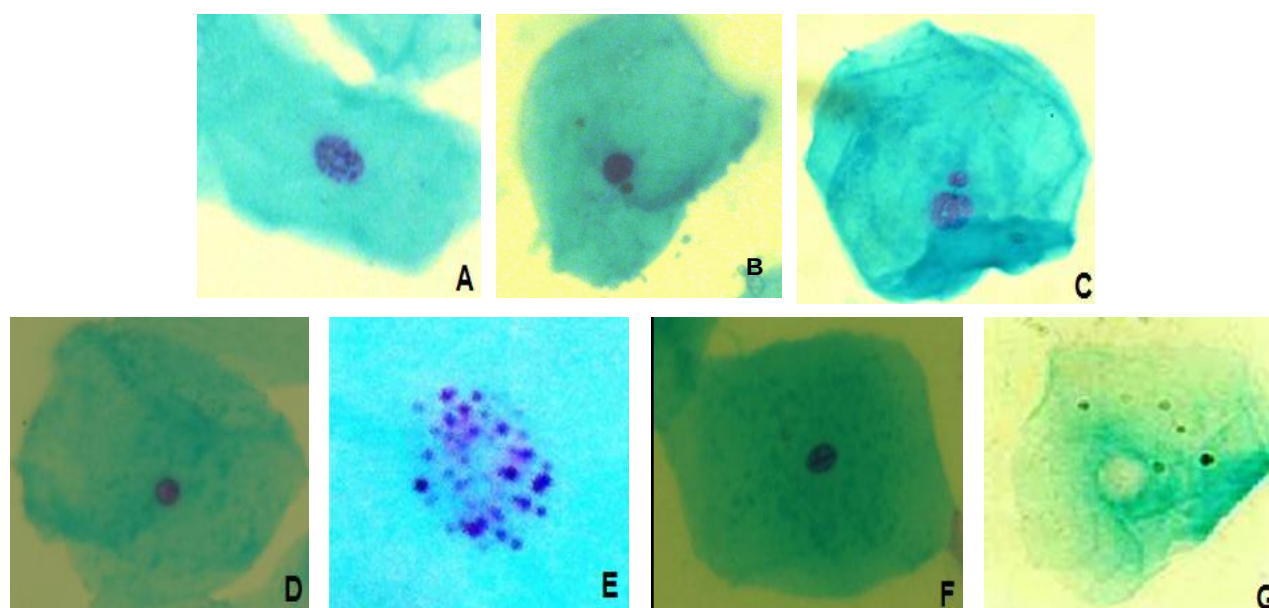


Figura 1 – Fotomicrografia de uma preparação de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Felguen/Fast grenn apresentando morfologia nuclear normal (A), micronúcleo (B), *broken-eggs* (C), picnose (D), cariorréxis (E), cromatina condensada (F) e cariólise (G).

Tabela 4 – Ocorrência de micronúcleos (MN) e de alterações citológicas na mucosa oral de usuários de esteróides anabólico-androgênicos.

G1	MN	C.Condensada	Cariorréxis	Cariólise	B.eggs	Picnose
1	1	21	95	10	0	17
2	2	19	117	15	0	7
3	1	11	86	8	0	9
4	1	33	116	12	0	3
5	0	51	103	26	0	33
6	0	24	127	21	0	12
7	0	16	280	2	0	7
8	6	18	63	11	0	20
9	5	31	122	8	0	15
10	5	27	107	23	0	9
11	0	14	105	75	0	5
12	0	27	210	70	0	19
13	2	16	163	19	1	14
14	0	48	97	14	0	5
15	2	10	69	11	0	12
16	1	23	109	19	0	10
17	0	31	115	8	0	7
18	0	22	201	21	0	6
19	0	3	92	11	0	11
20	1	21	85	13	1	16
21	0	22	155	3	0	22
22	1	23	124	19	0	12
23	0	48	66	3	0	32
24	0	0	43	4	0	1
25	0	23	103	0	0	2

C. condensada = Cromatina condensada; MN = Micronúcleo; B. Eggs = Broken eggs.

A análise estatística comparando as frequências de micronúcleo, cariólise e *broken-eggs* não revelou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,975$, $p > 0,75$ e $p > 0,25$, respectivamente). A ocorrência de apoptose, inferida pelo somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose foi significativamente mais frequente em células de indivíduos do G2 ($p < 0,005$). (Tabela 6).

A análise da ocorrência de micronúcleos nos indivíduos do G1 em função do modo de uso de EAA revelou

que a frequência destas estruturas nas células dos participantes que faziam uso simultâneo de dois ou três EAA foi significativamente maior do que a observada entre os que utilizavam apenas um tipo de EAA ($p < 0,005$). A comparação, contudo, da ocorrência de micronúcleos entre os indivíduos que faziam uso simultâneo de EAA e os indivíduos do G2, não mostrou diferença significativa ($p > 0,1$). Em relação à frequência de apoptose e *broken eggs*, não foi observada diferença estatística em função do modo de uso. A ocorrência de

cariólise, no entanto, foi aos que faziam uso exclusivo de um tipo singnificativamente maior entre os de EAA ($p < 0,005$) (Tabela 7). usuários que associavam EAA em relação

Tabela 5 – Ocorrência de micronúcleos (MN) e de alterações citológicas na mucosa oral de não-usuários de esteróides anabólico-androgênicos.

G2	MN	C. Condensada	Cariorréxis	Cariólise	<i>B. eggs</i>	Picnose
1	0	28	122	16	0	7
2	0	29	84	11	0	6
3	3	30	123	20	0	11
4	3	21	82	9	0	5
5	1	49	137	10	0	17
6	1	20	115	20	0	11
7	2	19	80	39	0	1
8	5	20	140	16	1	11
9	0	8	63	25	0	0
10	0	6	113	16	0	1
11	0	28	140	24	0	13
12	4	33	200	43	2	19
13	0	22	174	30	0	26
14	4	36	176	15	0	8
15	0	48	196	16	0	42
16	0	48	190	14	0	9
17	1	11	140	23	0	11
18	2	27	174	29	1	33
19	0	45	155	10	0	15
20	0	34	202	37	1	23
21	0	15	152	0	0	4
22	0	31	110	2	0	27
23	0	24	51	0	1	6
24	1	22	63	5	1	3
25	1	27	132	17	0	12
26	1	19	112	7	0	6
27	1	5	81	1	0	1
28	1	26	129	16	0	12
29	0	2	53	2	1	0
30	1	25	127	16	0	11

C. condensada = Cromatina condensada; MN = Micronúcleo; *B. Eggs* = *Broken eggs*

Tabela 6 – Ocorrência de alterações genéticas e citológicas na mucosa oral de usuários e não-usuários de esteróides anabólico-androgênicos do Município de Feira de Santana/BA.

Marcador citogenético	G1		G2		Parâmetros estatísticos	
	OBS.	ESP.	OBS.	ESP.	χ^2	P**
MN	28	27,272727	32	32,727273	0,0356	p>0,975
Apoptose*	3840	3984,0909	4925	4780,9091	9,554003	p<0,005
Cariólise	426	415,909091	489	499,090909	0,44885246	p>0,75
<i>Broken-eggs</i>	2	4,54545455	8	5,45454545	2,6133333	p>0,25

MN = Micronúcleo; OBS = observado; ESP. = esperado; *# Cromatina condensada, cariorréxis e picnose; **Grau de liberdade = 1

Tabela 7 – Ocorrência de alterações genéticas e citológicas na mucosa oral de usuários que fazem associações de esteróides anabólico-androgênicos no Município de Feira de Santana/BA.

Marcador citogenético	Associação		Não Associação		Parâmetros estatísticos	
	OBS.	ESP.	OBS.	ESP.	χ^2	P**
MN	22	14,560000	6	13,440000	7,9203	p<0,005
Apoptose*	2017	1996,8000	1823	1843,2000	0,425723	p>0,75
Cariólise	254	221,520000	172	204,480000	9,921512	p<0,005
<i>Broken-eggs</i>	1	1,04	1	0,96	0,003205	p>0,975

MN = Micronúcleo; OBS = observado; ESP. = esperado; *# Cromatina condensada, cariorréxis e picnose; **Grau de liberdade = 1

DISCUSSÃO

O aspecto físico tem sido frequentemente debatido, pois a busca de um corpo considerado perfeito tem sido cada vez mais intensa (30). Desde que as práticas esportivas foram incorporadas ao cotidiano dos seres humanos, a sociedade convive com a busca por substâncias que melhorem a capacidade física do corpo (30,47).

De acordo com Freitas (14) atualmente, em diversos grupos sociais, existe uma frequente preocupação em

melhorar o desempenho físico, ignorando as consequências à saúde das práticas empregadas para tal objetivo. Segundo Júnior *et al.* (30), muitos atletas, profissionais e amadores, fazem uso dos EAA, frequentemente, sem prescrição médica pondo em risco a saúde humana. Para Santos e Santos (54) esta banalização do consumo de EAA se deve à facilidade de acesso a essas substâncias que podem ser comercializadas de forma ilegal em farmácias e academias.

O uso dos esteróides anabólico-androgênicos entre atletas foi registrado, primeiramente, no início da década de 50 e popularizado em diversos grupos sociais no decorrer dos anos seguintes, principalmente, a partir dos jogos olímpicos de 1964 (69). Embora alguns atletas continuem fazendo uso dos EAA para aumentar seu rendimento nas competições esportivas, o uso destes hormônios ultrapassou as competições esportivas oficiais tornando-se frequente nas academias cujos usuários buscam o aumento da massa muscular, de sua força e suposta atratividade advinda das propriedades anabólicas e androgênicas destes esteróides (10,59).

Segundo a Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva (59), a partir de um estudo realizado com 2.663 participantes de 81 países, o usuário típico de EAA é do sexo masculino com faixa etária próxima aos trinta anos, não-atleta profissional, que objetiva o aumento da musculatura. Corroborando estes resultados, na presente pesquisa, durante a fase de seleção da amostra e coleta de dados, apenas indivíduos do sexo masculino se identificaram como usuários de EAA.

A média de idade dos participantes, desta pesquisa, pode ser considerada jovem: $24,04 \pm 5,36$ anos em G1 e $24,38 \pm 5,57$ anos em G2. Pavão *et al.* (45) em estudo objetivando avaliar o potencial

genotóxico de EAA também observaram frequência de uso destes produtos em jovens (média de idade de $22,7 \pm 3,61$). O uso de EAA por jovens foi ratificado por Júnior *et al.* (30) em trabalho com objetivo de traçar um perfil do usuário. Estes autores observaram que a maior ocorrência foi entre indivíduos com média de idade de $22,90 \pm 5,735$ anos e ressaltaram a faixa etária como sendo um fator importante para determinar a frequência de exercícios físicos, pois segundo estes autores quanto maior a faixa etária menor a prática de exercícios físicos e de uso de anabolizantes.

O hábito de fumar no G1 foi relatado por apenas dois participantes, e embora a ingestão de bebidas alcoólicas tenha sido informada por todos, o consumo pode ser considerado moderado. Estes resultados então de acordo com o perfil de usuários relatado pela Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva (59). Segundo este órgão os usuários de EAA em sua maioria seguem regimes de uso planejado sem consumo abusivo de outras drogas.

Nesta pesquisa os perfis obtidos em ambos os grupos são semelhantes, diferindo especialmente quanto ao uso ou não uso de EAA. Assim, não ocorreram diferenças estatísticas, entre G1 e G2, com relação aos hábitos de fumar, consumo de bebidas alcoólicas, exposição a agentes

tóxicos e prática de exercícios físicos. Devido a esta similaridade entre os grupos as diferenças observadas nas frequências de alterações nucleares na análise citogenética possivelmente estão relacionadas ao uso de EAA.

Pavão *et al.* (45) utilizando o teste do cometa (capaz de detectar lesões primárias no DNA) avaliaram o potencial genotóxico de EAA. Estes autores coletaram amostras de sangue periférico de 63 voluntários, agrupados em praticantes de fisiculturismo não competitivo que fazem uso de esteróides anabolizantes (23 participantes); fisiculturistas não usuários dos esteróides (20 participantes); e grupo controle (20 participantes) e observaram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de danos no DNA de leucócitos do sangue periférico entre os grupos avaliados.

No presente estudo, embora não se tenha utilizado o mesmo tipo de teste citogenético e o material biológico analisado não terem sido células sanguíneas, os resultados corroboram os de Pavão *et al.* (45). Nesta pesquisa, a aplicação do Teste de Micronúcleo, segundo o protocolo proposto por Tolbert *et al.* (65), em células esfoliadas da mucosa oral não demonstrou diferença estatística na frequência de MN em ambos os grupos, sugerindo que os EAA analisados não tem efeito clastogênico e/ou aneugênico.

Por outro lado, Torres-Bugarín *et al.* (67) utilizando o Teste de Micronúcleos em esfoliadas de mucosa oral sugerem que EAA tem efeito genotóxico. A pesquisa foi realizada com 11 fisiculturistas, divididos em usuários de EAA (5 participantes que faziam uso com frequência semanal) e não usuários (6 participantes). A ocorrência de MN foi avaliada semanalmente durante quatro semanas. A frequência de MN foi significativamente maior entre os usuários.

No entanto, apesar de não ter sido relatado por Torres-Bugarín *et al.* (67), o modo de uso de EAA dos participantes é provável que o potencial genotóxico identificado se deva ao uso associado de diferentes marcas. Neste estudo, a análise da frequência de MN em função do uso associado das três marcas e de exclusivamente uma, revelou que aqueles usuários que associam EAA apresentaram maior frequência de MN, sugerindo uma ação sinérgica das marcas avaliadas na promoção de danos genéticos. Segundo Mcardle, Katch e Katch (40), a combinação de várias substâncias para compor os ciclos de administração da droga potencializa efeitos colaterais que podem superar, significativamente, quaisquer benefícios do tratamento com esteróides anabolizantes androgênicos.

A ocorrência de apoptose inferida pelo somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose, sugerido por Tolbert

et al. (66), revelou diferenças entre usuários (G1) e não usuários (G2). Entre os indivíduos do G2 a frequência de apoptose foi significativamente maior, sugerindo que os EAA interferem em vias de inibição de apoptose. A apoptose é um mecanismo geneticamente programado de morte celular importante na eliminação de células alteradas que podem ser prejudiciais para o organismo (42) e no controle da homeostase dos tecidos que se renovam (1).

Tentori e Graziani (63) ressaltam que os hormônios androgênicos podem inibir a resposta celular ao mecanismo de apoptose, além de atuar em outras vias de inibição ainda não esclarecidas. Segundo Niu *et al.* (43), em estudo realizado com células da próstata, os hormônios androgênicos podem inibir a apoptose e direcionar o processo de proliferação e diferenciação celular através da regulação da expressão gênica, processo que ocorre segundo Carson III e Rittmaster (4) devido à ligação intranuclear entre os EAA e os receptores androgênicos.

A diferenciação e proliferação celular prostática e o controle na expressão do receptor de andrógeno são processos considerados chaves na formação do câncer prostático e são regulados integralmente pelos níveis de andrógenos (34), hormônios estes que estão envolvidos

em um mecanismo biológico de regulação do crescimento celular (16).

Assim, os resultados deste estudo no que se referem à ocorrência de apoptose sugerem que a associação positiva entre exposição à EAA e câncer relatada em diversos estudos (15, 21, 23, 34, 57, 58) decorre da ação deste hormônio na inibição de apoptose e não de efeitos clastogênicos ou aneugênicos que se traduziriam em uma maior ocorrência de micronúcleos. Células que têm vias de apoptose inibidas podem proliferar e ao longo de gerações celulares acumulare danos genéticos, o que pode contribuir para transformação maligna.

Este mecanismo foi ressaltado por Schulte-Hernann *et al.* (55) que destacaram a morte celular programada como um mecanismo fundamental para manter o equilíbrio da quantidade de células nos tecidos, eliminando células que estão em excesso ou que sofreram injúrias no DNA.

Nesta pesquisa, ambos os grupos (G1 e G2) não diferiram significativamente quanto a frequência de cariólise e de *Broken eggs*, alterações nucleares que segundo Tolbert *et al.* (66) e Holland *et al.* (25) são indicativas, respectivamente, de necrose relacionada a eventos citotóxicos e amplificação gênica. Estes dados apontam para a ausência de citotoxicidade, detectada pela ocorrência de cariólise, relacionada ao uso dos esteróides anabólico-androgênicos.

Porém, a combinação de diferentes variedades de EAA pode potencializar ou gerar um efeito citotóxico quando comparado ao uso de apenas uma marca de EAA, sugerindo um efeito sinérgico. O uso simultâneo de derivados sintéticos de testosterona potencializa os seus efeitos colaterais (40).

CONCLUSÕES

Os EAA avaliados quando utilizados de modo isolado não apresentam efeito clastogênico e/ou aneugênico.

Possivelmente, quando em associação, os esteróides anabolizantes androgênicos tem efeito potencializado podendo ser genotóxicos e/ou citotóxicos.

Os resultados obtidos mostram inibição da apoptose induzida pelo uso de EAA, sugerindo que este, pode ser um dos mecanismos que contribuem para a associação descrita entre uso destas substâncias e o processo carcinogênico.

Fonte de recursos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Birchall, M. A. *et al.* Apoptosis in Normal Epithelium, Premalignant and Malignant Lesions of the Oropharynx and Oral Cavity: a Preliminary Study. *Oral Oncology, European Journal Cancer*. 1995; 31(6):380-383.
2. Bloching, M. *et al.* Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology*, 2008; 36:550-555.
3. Bragança-Pereira, C. A. “Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética”. In Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L.A. R., Maonteone Neto, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. *Sociedade Brasileira de Genética*. São Paulo. 1991.
4. Carson III, C; Rittmaster, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003; 61(4): A1-7.
5. Cavallo, D., Ursini, C. L, Perniconi, B., Francesco, A. D., Giglio, M., Rubino, F. M., Marinaccio, A., & Iavicoli, S. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutation Researc*. 2005; 587: 45-51.
6. Célérier, E. *et al.* Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. *Neuropharmacology*. 2006; 50:788-806.
7. Chaves, E. A. *et al.* Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2006; 99(4-5):223-230.
8. Courtine J. J. Os Stakhanovistas do narcisismo: Body-building e puritanismo ostentatório na cultura americana. In Sant’anna D. B. (orgs) Políticas do Corpo. *Editora Estação Liberdade*. São Paulo. 1995.

9. Dhillon, V. S., Singh, H., Kler, R. In vitro and in vivo genotoxicity of hormonal drugs VI. Fluoxymesterone. *Mutation Research*. 1995; 342:103-111.
10. Dohle, G. R; Smit, M; Weber, R. F. A. Androgens and male fertility. *World Journal Urology*. 2003; 21:341-45.
11. Far, H. R. M. *et al.* Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2007; 131:189-197.
12. Fletcher, Robert H.; Fletcher, Suzanne W.; Wagner, Edward H. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. Porto Alegre. 1996.
13. Freitas, V.S.; Lopes, M.A.; Meireles, J.R.C.; Reis, L.; Cerqueira, E.M.M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2005; 29:189-199.
14. Freitas, G. G. O esquema corporal, a imagem corporal, a consciência corporal e a corporeidade. Editora UNIJUI. UNIJUI. 2004.
15. Friedenreich, C.M; Thune, I. A review of physical activity and prostate cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2001; 12(5):46-475.
16. Gao, J.; Arnold, J.T.; Isaacs, J.T. Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Research*. 2001; 61(13):5038-5044.
17. Ghorbanihaghjo, A. *et al.* Effect of nandrolone decanonate on paraoxonase activity in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38(12):1076-80.
18. Guembarovski, R. L; Cólus, I. M. S. Câncer: uma doença genética. *Genética na escola*. Sociedade Brasileira de Genética. 2008; ano 3(1):4-7.
19. Guerra, M. R. *et al.* Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancelorogia*. 2005; 51:227-234.
20. Guerra, T. M. M. *et al.* Avaliação de Espermograma e PSA em praticantes de Musculação Atlética (Fisiculturistas). *Fitness & Performance Journal*. Rio de Janeiro. 2005; 4(4):220 – 226.
21. Haupt H. A; Rovere G. D. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am. ft. Sports Medicine*. 1984; 12:469-483.
22. Heepchantree, W; Paratasilpin, T; Kangwanpong, D. A. Comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer using the chromosome aberration and the micronucleus tests. *Mutation Research*. 2005; 587:134-139.
23. Hickson R. C; Ball K. L; Falduto M. T. Adverse effects of anabolic steroids. *Medicine Toxicology. Adverse Drug Exposition*. 1989; 4:254-271.
24. Holden, H. E., Studwell, D., Majeska J. B. Oxymetholone: I. Evaluation in a comprehensive battery of genetic toxicology and in vitro transformation assays. *Toxicology Pathology*. 1999; 27:501-506.
25. Holland, N. *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*. 2008; 659:93-108.
26. Iriart, J. A. B; Andrade, T. M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre

- jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 2002; 18:1379-1387.
27. Irving, L; Wall, M; Neumark-Sztainer, D; Story, M. Steroid use among adolescents: finding from project EAT. *Adolescent Health*. 2002; 30:243-252.
28. Jekel, James F.; Katz, David L.; Elmore, Joann G. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. *Artmed*. Porto Alegre. 2005.
29. Joosten, H. F. P. *et al.* Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters*. 2004; 151:113-134.
30. Júnior, S. H. A. S; Souza, I; Silva, J. H. A; Oliveira, J. W; Souza, M. A. Perfil de atletas academia: o uso de anabolizantes e suplementos nos programas de atividade física. *Revista Digital*. Buenos Aires. 2008; Año 13(119).
31. Kalbfleisch, J. G. Probability and statistical inference. *Springer-verlag*. New York. 1979.
32. Liljeqvist, S. *et al.* Pulmonary embolism associated with the use of anabolic steroids. *European Journal of Internal Medicine*. 2008; 19:214-215.
33. Machado-Santelli, G. M., Cerqueira, E. M., Oliveira, C. T. & Pereira, C. A. B. (1994). Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Research*. 1994; 322:203-208.
34. Maitland, N. J. Exploitation of prostate gene expression to develop targeted therapies. *Acta Biomedicine*. 2003; 74(2):105-106.
35. Maravelias, C. *et al.* Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicology Letters*. 2005; 158:167-175.
36. Marques, M. A. S. *et al.* Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Revista Brasileira de Medicina Esportiva*. 2003; 9.
37. Martelli, A. *et al.* Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutation Research*. 2003; 536:69-78.
38. Martins, R. A. *et al.* Chromosome damage and cytotoxicity in oral mucosa cells after 2 mounths of exposure to anabolic steroids (decadurabolin and winstrol) in weight lifting. *Steroids*. 2010; 75:952-955.
39. Mattioli, F. *et al.* DNA fragmentation, DNA repair and apoptosis induced in primary rat hepatocytes by dienogest, dydrogesterone and 1,4,6-androstatriene-17 α -ol-3-one acetate. *Mutation Research*. 2004; 564:21-29.
40. Mcardle, W. D; Katch, F. I; Katch, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro. 1992.
41. Nantermet, P. V. *et al.* Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *Journal Biology Chemistry*. 2004; 279: 1310-1322.
42. Nikitakis, N. G. *et al.* Role of apoptosis in oral disease: Mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 2004; 97(4):476-90.
43. Niu, Y; Xu, Y; Zhang, J. *et al.* Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. *BJU International*. 2001; 87:386-93.

44. Oliveira, S. M. *et al.* Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. *Cell Biology International*. 2007; 31(3):235-245.
45. Pavão, P. R. G. *et al.* Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. *Revista brasileira de educação física especializada*. São Paulo. 2007;21(1):5-10.
46. Pereira, A. D. *et al.* First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2580-2584.
47. Philippi, J. M. S. O uso de suplementos alimentares e hábitos de vida de universitários: o caso da UFSC. [Dissertação de Mestrado]. UFSC. Florianópolis, 2004.
48. Reimann R; Kalweit S; Lang R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. 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*. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 1996; 28:133-144.
49. Ribeiro, L. R. *et al.* Mutagênese Ambiental. *Editora ULBRA*. Canoas, 2003.
50. Rouquayrol, Maria Zélia; Almeida Filho, Naomar. Epidemiologia & Saúde. *MEDSI/Ganabara Koogan*. Rio de Janeiro. 2003.
51. Sailaja, N. *et al.* Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research*. 2006; 609:74-80.
52. Salama, S. A., Serrana, M., & Au, W. W. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutation Research*. 1999; 436:99-112.
53. Salas-Ramirez, K. Y. *et al.* Anabolic androgenic steroids differentially affect social behaviors in adolescent and adult male Syrian hamsters. *Hormones and Behavior*. 2008; 53(2):378-85, 2008.
54. Santos, M. A. A; Santos, R. P. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. *Revista paulista de Educação Física*. São Paulo. 2002; 16(2):174-185.
55. Schulte-Hernann, R; Grasl-Kraupp, B; Bursch, W. Dose–response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. *Mutation Research*. 2000; 3(464(1)):13-18.
56. Seraj, M. J. *et al.* DNA adduct formation by hormonal steroids *in vitro*. *Mutation Research*. 1996; 370:49-59.
57. Shirai, T. *et al.* Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutation Research*. 2000; 462(2-3):219-26.
58. Silva, P. R. P. *et al.* Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina Esportiva*. 2002; 8(6).
59. SINE. *Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva*. 2007. Disponível em: <http://www.sportsnutritionssociety.org/>. (Acessado em 02/10/2012).
60. Souza, E. S; Fisberg, M. O uso de esteróides anabolizantes na adolescência. 2009. Disponível em: <http://www.brazilpednews.org.br/mar2002/bnp3302.pdf> (Acessado em 10/05/2010).
61. Souza, J. P. Avaliação genotóxica em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de esteróides anabolizantes androgênicos. Monografia – Curso de Especialização em Biologia Celular,

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

62. Steensland, P. *et al.* Amphetamine-induced aggression is enhanced in rats pretreated with the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate. *Steroids*. 2005; 70:199-204.

63. Tentori; Graziani, G. Doping with growth hormone/IGF-1, anabolic steroids or erythropoietin: is there a cancer risk? *Pharmacological Research*. 2007; 55:359-369.

64. Thomas, P. *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009; 4:825-837.

65. Tolbert, P. E; Shy, C. M; Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. Journal Epidemiology*. 1991; 134:840-50.

66. Tolbert, P. E; Shy, C. M; Allen, J. W. "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development". *Mutation Research*. 1992; 271:69-77.

67. Torres-Bugarín, O; Covarrubias-Bugarín, R; Zamora-Perez, A. L; Torres-Mendoza, B. M; García-ulloa, M; Martínez-Sandoval, F. G. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *Br J Sports Med*. 2007; 41:592-596.

68. Valadares, B. L. B. Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

69. Yesalis, C. E. Anabolic steroids in sport and exercise. Champaign, IL, *Editora Human Kinectis*. 1993.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os diversos efeitos indesejados associados ao uso de EAA, o risco de ocorrência de câncer entre usuários tem sido relatado (SILVA *et al.*, 2002), mas a ação destas substâncias na iniciação e desenvolvimento da doença não é clara, uma vez que o número de estudos para avaliar a genotoxicidade e/ou carcinogenicidade dos EAA é considerado pequeno (JOOSTEN *et al.*, 2004). Alguns autores destacam, no entanto, alterações genéticas ou citológicas que corroboram a possível atividade genotóxica e/ou carcinogênica dos EAA (DHILLON *et al.*, 1995; SERAJ *et al.*, 1996; SHIRAI *et al.*, 2000; NIU *et al.*, 2001; MATTIOLO *et al.*, 2004; NANTERMET *et al.*, 2004; TORRES-BUGÁRIN *et al.*, 2007; TENTORI, GRAZIANI, 2007; SOUZA, 2010).

Entretanto, a despeito destes estudos nos quais pesquisadores associaram positivamente danos genéticos e/ou carcinogenicidade à exposição à esteróides androgênicos, outros autores não relataram tal associação (REIMANN; KALWEIT; LANG, 1996; HOLDEN; STUDWELL; MAJESKA, 1999; MARTELLI *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2010).

Deste modo, a ocorrência de efeitos genotóxicos associados ao uso de EAA é um tema ainda controverso, sugerindo a necessidade de produção de novos trabalhos sobre a temática. Assim, nesta investigação procurou-se avaliar a distribuição de biomarcadores indicativos de danos cromossômicos, apoptose e necrose entre os grupos populacionais caracterizados pelo consumo destas substâncias, caracterizando um importante problema de saúde pública.

A avaliação dos efeitos genotóxicos e/ou citológicos dos esteróides anabolizantes androgênicos tem sido realizada com o uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas do epitélio oral de usuários uma vez que a avaliação da ocorrência de danos genéticos e demais alterações citológicas, feita com o uso deste teste apresenta inúmeras vantagens, entre as quais se incluem: 1) o baixo custo, 2) fácil acesso ao material para estudo, 3) simplicidade da análise, 4) a detecção dos efeitos tanto de agentes aneugênicos quanto de agentes clastogênicos e 5) a inferência de risco aumentado de desenvolvimento do câncer antes que ocorram sintomas clínicos (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1991; TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992; MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; SALAMA *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2003; CAVALLO *et al.*, 2005; THOMAS *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no presente estudo de corte transversal mostram que: 1) os EAA avaliados quando utilizados de modo isolado não apresentam efeito clastogênico e/ou

aneugênico; 2) quando em associação, os esteróides anabolizantes androgênicos tem efeito genotóxico e/ou citotóxico potencializado; 3) a inibição da apoptose induzida pelo uso de EAA, sugerindo que este seja um mecanismo importante na associação descrita entre o uso destas substâncias e o processo carcinogênico.

Deste modo, esses achados apontam para a necessidade de que importantes medidas preventivas devam ser tomadas em relação à popularização e conseqüente utilização dos EAA, uma vez que estes são substâncias que podem levar a sérias implicações à saúde humana, entre elas, o câncer (SILVA *et al.*, 2002; IRIART; ANDRADE, 2002; GUERRA *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2006; FAR *et al.*, 2007; VALADARES, 2007).

Este estudo é, portanto, uma contribuição ao campo da epidemiologia genética, que avalia os efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos nas populações. E através da avaliação dos efeitos da utilização dos esteróides anabolizantes androgênicos nas alterações celulares genotóxicas e/ou citológicas, o presente trabalho, poderá se constituir em importante referência neste campo.

REFERÊNCIAS

BIRCHALL, M. A. *et al.* Apoptosis in Normal Epithelium, Premalignant and Malignant Lesions of the Oropharynx and Oral Cavity: a Preliminary Study. **Oral Oncology, European Journal Cancer**, v. 31B, n. 6 p. 380-383, 1995.

BLOCHING, M. *et al.* Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncology**, v. 36 p. 550-555, 2008.

BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. “Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética”. In RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A. LA. R., MAONTELEONE NETO, R. *Mutagenese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.* **Sociedade Brasileira de Genética.** São Paulo, 1991.

CARSON III, C; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v.61, n.4A p.1-7, 2003.

CAVALLO, D., URSINI, C. L, PERNICONI, B., FRANCESCO, A. D., GIGLIO, M., RUBINO, F. M., MARINACCIO, A., & IAVICOLI, S. (2005). Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated cells of oncology nurses and pharmacy employees. **Mutation Research**. 587, 45-51.

CÉLÉRIER, E. *et al.* Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. **Neuropharmacology**, v. 50, p. 788-806, 2006.

CHAVES, E. A. *et al.* Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 99, n. 4-5 p. 223-230, 2006.

COURTINE J. J. Os Stakhanovistas do narcisismo: Body-building e puritanismo ostentatório na cultura americana. In SANT’ANNA D. B. (orgs) *Políticas do Corpo.* **Editora Estação Liberdade.** São Paulo, 1995.

DHILLON, V. S., SINGH, H., KLER, R. In vitro and in vivo genotoxicity of hormonal drugs VI. Fluoxymesterone. **Mutation Research**, v. 342, p. 103-111, 1995.

DOHLE, G. R; SMIT, M; WEBER, R. F. A. Androgens and male fertility. **World Journal Urology**, v. 21, p. 341-45, 2003.

FAR, H. R. M. *et al.* Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 131, p. 189-197, 2007.

FLETCHER, ROBERT H.; FLETCHER, SUZANNE W.; WAGNER, EDWARD H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

FREITA, V.S.; LOPES, M.A.; MEIRELES, J.R.C.; REIS, L.; CERQUEIRA, E.M.M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista**

Baiana de Saúde Pública., v. 29, p. 189-199, 2005.

FREITAS, G. G. O esquema corporal, a imagem corporal, a consciência corporal e a corporeidade. **Editora UNIJUI**. UNIJUI, 2004.

FRIEDENREICH, C.M; THUNE, I. A review of physical activity and prostate cancer risk. **Cancer Causes Control.**, v.12, n. 5 p.46-475, 2001.

GAO, J.; ARNOLD, J.T.; ISAACS, J.T. Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. **Cancer Research.**, v. 61, n. 13 p.5038-5044, 2001.

GHORBANIHAGHJO, A. *et al.* Effect of nandrolone decanotate on paraoxonase activity in hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry.**, v. 38 n. 12 p.1076-80, 2005.

GUEMBAROVSKI, R. L; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética na escola**. Sociedade Brasileira de Genética., ano 3, v. 1, p. 4-7, 2008. Disponível em: <http://geneticanaescola.com.br/ano3vol1/2.pdf> (Acessado em 16/09/2010).

GUERRA, M. R. *et al.* Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia.**, v. 51, p. 227-234, 2005.

GUERRA, T. M. M. *et al.* Avaliação de Espermograma e PSA em praticantes de Musculação Atlética (Fisiculturistas). **Fitness & Performance Journal**. Rio de Janeiro., v. 4, n. 4 p. 220 – 226, 2005.

HAUPT H. A; ROVERE G. D. Anabolic steroids: a review of the literature. **Am. ft. Sports Medicine.**, v. 12, p. 469-483, 1984.

HEEPCHANTREE, W; PARATASILPIN, T; KANGWANPONG, D. A. Comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer using the chromosome aberration and the micronucleus tests. **Mutation Research.**, v. 587, p. 134-139, 2005.

HICKSON R. C; BALL K. L; FALDUTO M. T. Adverse effects of anabolic steroids. **Medicine Toxicology. Adverse Drug Exposition.**, v. 4, p. 254-271, 1989.

HOLLAND, N. *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res.**, v. 659, p. 93-108, 2008.

HOLDEN, H. E., STUDWELL, D., MAJESKA J. B. Oxymetholone: I. Evaluation in a comprehensive battery of genetic toxicology and in vitro transformation assays. **Toxicology Pathology.**, v. 27: 501-506, 1999.

IRIART, J. A. B; ANDRADE, T. M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro., v. 18: 1379-1387, 2002.

IRVING, L; WALL, M; NEUMARK-SZTAINER, D; STORY, M. Steroid use among adolescents: finding from project EAT. **Adolescent Health.**, v. 30, p. 243–252, 2002.

JEKEL, JAMES F.; KATZ, DAVID L.; ELMORE, JOANN G. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOOSTEN, H. F. P. *et al.* Genotoxicity of hormonal steroids. **Toxicology Letters.**, v. 151, p. 113-134, 2004.

JÚNIOR, S. H. A. S; SOUZA, I; SILVA, J. H. A; OLIVEIRA, J. W; SOUZA, M. A. Perfil de atletas academia: o uso de anabolizantes e suplementos nos programas de atividade física. **Revista Digital**. Buenos Aires., Año 13, n. 119, 2008.

KALBFLEISCH, J. G. Probability and statistical inference. **Springer-verlag**. New York, 1979.

LILJEQVIST, S. *et al.* Pulmonary embolism associated with the use of anabolic steroids. **European Journal of Internal Medicine.**, v. 19, p. 214–215, 2008.

MACHADO-SANTELLI, G. M., CERQUEIRA, E. M., OLIVEIRA, C. T. & PEREIRA, C. A. B. (1994). Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**. 322, 203-208.

MAITLAND, N. J. Exploitation of prostate gene expression to develop targeted therapies. **Acta Biomedicine.**, 74, n. 2 p. 105-106, 2003.

MARAVELIAS, C. *et al.* Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. **Toxicology Letters.**, v. 158, p. 167-175, 2005.

MARQUES, M. A. S. *et al.* Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva.**, v. 9, 2003.

MARTELLI, A. *et al.* Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. **Mutation Research.**, v. 536, p. 69-78, 2003.

MARTINS, R. A. *et al.* Chromosome damage and cytotoxicity in oral mucosa cells after 2 months of exposure to anabolic steroids (decadurabolin and winstrol) in weight lifting. **Steroids**. v. 75, p. 952-955, 2010.

MATTIOLI, F. *et al.* DNA fragmentation, DNA repair and apoptosis induced in primary rat hepatocytes by dienogest, dydrogesterone and 1,4,6-androstatriene-17 α -ol-3-one acetate. **Mutation Research.**, v. 564, p. 21–29, 2004.

McARDLE, W. D; KATCH, F. I; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro, 1992.

NANTERMET, P. V. *et al.* Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. **Journal Biology Chemistry.**, v. 279, p. 1310-1322, 2004.

NIKITAKIS, N. G. et al. Role of apoptosis in oral disease: Mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics.**, v. 97 n. 4 p. 476-90, 2004.

NIU, Y; XU, Y; ZHANG, J. *et al.* Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **BJU International.**, v. 87, p. 386-93, 2001.

OLIVEIRA, S. M. *et al.* Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. **Cell Biology International.**, v. 31, n. 3 p. 235-245, 2007.

PAVÃO, P. R. G. *et al.* Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Revista brasileira de educação física especializada.** São Paulo., v.21, n.1, p.5-10, 2007.

PEREIRA, A. D. *et al.* First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 46, p. 2580-2584, 2008.

PHILIPPI, J. M. S. O uso de suplementos alimentares e hábitos de vida de universitários: o caso da UFSC. [Dissertação de Mestrado]. **UFSC.** Florianópolis, 2004.

REIMANN R; KALWEIT S; LANG R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. 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*. **Environmental Molecular Mutagenesis.**, v. 28, p. 133-144, 1996.

RIBEIRO, L. R. *et al.* Mutagênese Ambiental. **Editores ULBRA.** Canoas, 2003.

ROUQUAYROL, MARIA ZÉLIA; ALMEIDA FILHO, NAOMAR. **Epidemiologia & Saúde.** Rio de Janeiro: MEDSI/Ganabara Koogan, 2003.

SAILAJA, N. *et al.* Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. **Mutation Research.**, v. 609, p. 74-80, 2006.

SALAMA, S. A., SERRANA, M., & AU, W. W. (1999). Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. **Mutation Research.** 436, 99-112.

SALAS-RAMIREZ, K. Y. *et al.* Anabolic androgenic steroids differentially affect social behaviors in adolescent and adult male Syrian hamsters. **Hormones and Behavior.**, v. 53, n. 2 p. 378-85, 2008.

SANTOS, M. A. A; SANTOS, R. P. **Uso** de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. **Revista paulista de Educação Física.** São Paulo., V. 16, N. 2 P. 174-185, 2002.

SCHULTE-HERNANN, R; GRASL-KRAUPP, B; BURSCH, W. Dose-response and threshold effects in cytotoxicity and apoptosis. **Mutation Research.**, v. 3, n. 464(1) p.13-18, 2000.

SERAJ, M. J. *et al.* DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. **Mutation Research**, v. 370 p. 49-59, 1996.

SHIRAI, T. *et al.* Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. **Mutation Research**, v. 462, n. 2-3 p. 219-26, 2000.

SILVA, P. R. P. *et al.* Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, v. 8, n. 6, 2002.

SINE. **Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva**. 2007. Disponível em: <http://www.sportsnutritionssociety.org/>. (Acessado em 02/10/2012).

SOUZA, E. S; FISBERG, M. O USO DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES NA ADOLESCÊNCIA. 2009. Disponível em: <http://www.brazilpednews.org.br/mar2002/bnp3302.pdf> (Acessado em 10/05/2010).

SOUZA, J. P. **Avaliação genotóxica em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de esteróides anabolizantes androgênicos**. Monografia - Especialização em Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

STEENSLAND, P. *et al.* Amphetamine-induced aggression is enhanced in rats pre-treated with the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate. **Steroids**, v. 70, p. 199-204, 2005.

TENTORI; GRAZIANI, G. Doping with growth hormone/IGF-1, anabolic steroids or erythropoietin: is there a cancer risk? **Pharmacological Research**, v. 55, p. 359-369, 2007.

THOMAS, P. *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. **Nature Protocols** v. 4, p. 825-837, 2009.

TOLBERT, P. E; SHY, C. M; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. Journal Epidemiology**, v. 134, p. 840-50, 1991.

TOLBERT, P. E; SHY, C. M; ALLEN, J. W. “Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development”. **Mutation Research**, v. 271, p. 69 – 77, 1992.

TORRES-BUGARÍN O, COVARRUBIAS-BUGARÍN R, ZAMORA-PEREZ AL, TORRES-MENDOZA BM, GARCÍA-ULLOA M, MARTÍNEZ-SANDOVAL FG. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. **Br J Sports Med**, v. 41, p. 592-596, 2007.

VALADARES, B. L. B. Avaliação de derivados sintéticos da testosterona pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2007.

YESALIS, C.E. Anabolic steroids in sport and exercise. Champaign, IL, **Editora Human Kinetics**, 1993.

APÊNDICE I

	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA Departamento de Saúde/ PPGSC - Mestrado Acadêmico Departamento de Ciências Biológicas/ Laboratório de Genética Toxicológica
---	--

QUESTIONÁRIO DE ENTREVISTA

Data: / /

Identificação:

01. Número:		02. Data de Nascimento:	
		/ /	
03. Idade:	04. Sexo:		
07. Endereço (Rua, Av.):		08. Nº	09. Aptº:
10. Bairro:	11. Cidade:	12. Estado:	13. CEP.:
14. Telefone:		15. Zona:	
16. Ocupação Atual:		17. Tempo de atividade:	
18. Ocupação Anterior:		19. Tempo de atividade:	

Hábitos de Fumar:

01. Hábitos Tabagistas:
() fuma () não fuma () nunca fumou () já fumou

Uso de Anabolizante:

01. Uso de Anabolizante:	02. Há quanto tempo.
() Sim () Não	() 1 a 6 meses. () 6 a 12 meses. () 1 ano a 1,5 ano () 1,5 ano a 2 anos. () mais de 2 anos _____ anos () Não se aplica.
03. Frequência de uso.	
() diária ____ vezes ao dia. () semanal ____ vezes por semana. () mensal ____ vezes por mês. () ocasionalmente. () Não se aplica	
04. Tipo do Anabolizante:	05. Marca(s).
() Oral () Intramuscular	
05. Observações	

Prática de exercício físico:

01. Prática exercício físico:	02. Há quanto tempo:
() Sim () Não	() 1 a 6 meses. () 6 a 12 meses. () 1 ano a 1,5 ano () 1,5 ano a 2 anos. () mais de 2 anos _____ anos () Não se aplica.
03. Frequência.	
() diária ____ vezes ao dia. () semanal ____ vezes por semana. () mensal ____ vezes por mês. () ocasionalmente. () Não se aplica	

04. Tipo:
05. Observações

Hábitos de Beber

01. Uso de bebida alcoólica: () Sim () Não	02. Frequência: () diariamente () 2 a 3 vezes/semana () 1 vez/semana () 1 vez/mês () ocasionalmente () raramente () Não se aplica	
03. Tipo de bebida/quanto bebe: () cachaça. ____ copos (200ml) () conhaque. ____ copos (200ml)	() cerveja. ____ copos (200ml) () whisky. ____ copos (200ml) () vinho. ____ copos (200ml)	() outras Quas(is): _____ ____ copos (200ml) () não se aplica
04. Há quanto tempo bebe: () menos de 6 meses () 6 meses a 1 ano () 01 a 05 anos () 05 a 10 anos () não se aplica		

Uso de medicamentos

01. Uso frequente de algum medicamento: () Sim () Não	
02. Frequência do uso de medicamento: () diariamente () 2 a 3 vezes/semana () 1 vez/semana () 1 vez/mês () ocasionalmente () raramente () não se aplica	03. Tempo de uso: () menos de 6 meses () 6 meses a 1 ano () 01 a 05 anos () 05 a 10 anos () não se aplica
04. Quais: () antibiótico () analgésico () antiinflamatório () antihistamínico () vitamina () antimicótico () anticonvulsionante () imunodepressores () antidepressivos () outros. Qual? _____. Nome do medicamento: _____	

Exposição à radiação

01. Exposição frequente a radiação: () Sim () Não	02. Tipo de radiação: () Ionizante () Não se aplica
03. Frequência de exposição a radiação:	04. Tempo de exposição:

Exposição a produtos tóxicos

01. Exposição a produtos tóxicos: () Sim () Não	02. Quais:
--	------------

APÊNDICE II
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Jeanderson Pereira Souza (mestrando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Estadual de Feira de Santana) estou, sob a orientação da Profa. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira, realizando estudo com o objetivo de investigar possíveis danos ao material genético (DNA) nas células da mucosa da boca que podem ter sido causados pelo uso de hormônios anabolizantes. Sabemos que o câncer é uma doença que decorre de alterações neste material, daí a importância de evidenciar compostos que tenham tais efeitos para que seu uso possa ser desaconselhado. O exame que fazemos, conhecido como Teste de Micronúcleo, é considerado uma medida de prevenção do câncer, principalmente do câncer oral. Os resultados obtidos com este exame não nos dizem se uma pessoa vai ter um câncer, mas mostram que a exposição a um dado agente (neste caso os anabolizantes) está pondo em risco a saúde e que é necessário evitar esta exposição. As conclusões a que chegaremos são possíveis apenas pela análise comparativa de muitos indivíduos, de modo que um resultado individual não informa por si só sobre os efeitos do agente investigado, mas no caso de serem observadas alterações em níveis acima do normal, e caso você o deseje, entraremos em contato com serviço especializado da UEFS para que seja feito exame de sua boca. O exame é rápido, seguro e feito com material esterilizado: uma escova pequena que vai ser gentilmente passada em sua bochecha, o que pode lhe causar algum desconforto por permanecer por alguns segundos com a boca aberta. Você pode também se sentir incomodado em responder a questões que serão feitas para preenchimento de um questionário, embora as perguntas digam respeito a hábitos de vida (como fumar e beber), uso de medicamentos e exposição a outros agentes que podem lesar o material genético, como por exemplo, os raios X. Além disso, garantimos a você que os resultados ficarão sob a nossa responsabilidade e nos comprometemos manter sigilo das informações, as quais serão utilizadas exclusivamente para essa pesquisa. Estes resultados ficarão no Laboratório de Genética Toxicológica, acessíveis apenas aos pesquisadores e não serão utilizados em outros estudos. As lâminas e os questionários permanecerão no laboratório por 5 anos, após este período serão destruídos. Você tem total liberdade de se recusar a participar deste estudo e também de desistir dele a qualquer momento. Nos colocamos ao seu dispor a qualquer momento para esclarecer dúvidas que tenha, seja pessoalmente no laboratório de Genética Toxicológica da UEFS, ou por telefone ou por e-mail (veja informações a este respeito abaixo). Após o término da pesquisa serão fornecidas informações sobre os resultados do estudo. Se você se sente devidamente esclarecido e concorda em participar do estudo assine, por favor, as duas vias deste documento (uma das quais ficará com você) que será também por nós também assinado.

Dados para contato:

Universidade Estadual de Feira de Santana/Departamento de Ciências
Biológicas, Laboratório de Genética Toxicológica. Av. Transnordestina, s/nº - Novo
Horizonte. Campus Universitário, Módulo I.

Feira de Santana – BA, CEP 44.036-900. Tel. (75) 3161-8285. e-mail:

jeanderson.biologia@ig.com.br eneida.cerqueira@gmail.com

Feira de Santana, ____ de _____ de ____.

Jeanderson Pereira Souza
(Pesquisador responsável)

Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
(Orientadora)

Participante