



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LEONARDO DA CUNHA MENEZES SOUZA

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM
LINFÓCITOS PARA USO COMO BIOMARCADOR DE RISCO
DE CÂNCER EM USUÁRIOS DE ESTEROIDES
ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**

LEONARDO DA CUNHA MENEZES SOUZA

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM
LINFÓCITOS PARA USO COMO BIOMARCADOR DO
RISCO DE CÂNCER EM USUÁRIOS DE ESTEROIDES
ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

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

Feira de Santana, BA
2013

Aos meus pais com carinho

AGRADECIMENTOS

A Deus pela serenidade e coragem em momentos adversos;

Ao meu pai e à minha mãe, por proporcionarem sempre um ambiente fértil ao aprendizado e à gentileza;

À prof^a Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira pela orientação segura, disponibilidade incondicional, e pelo carinho durante todos estes anos;

À Maíza Alves Lopes pela grande ajuda e agradável companhia durante o desenvolvimento do trabalho, tornando menos árdua à empreitada;

Ao professor José Roberto Cardoso Meireles pelos ensinamentos preciosos e grande ajuda ao longo de toda minha formação;

À Luciara Alves da Cruz, pela disponibilidade para com as coletas, sem a qual este trabalho não seria possível;

À Daisy Maria Favero Salvadori, à Luciana Maria Feliciano e à equipe da UNESP de Botucatu por terem me recebido tão bem e proporcionado treinamento necessário para execução deste trabalho;

À Susie Vieira, Lavínia Dórea, Rodrigo Rocha, Rodrigo Silva, Bruno Souza, Jeanderson Souza, Gabriela Carinhonha, Rosana Santos, Ísis Freitas, Leonardo Cerqueira, Polyana Carozo, Gregory, Cleiziane, Júlia, Paulo Jambeiro, que fizeram e fazem do LABGENTOX um lugar sempre muito agradável;

Ao meu amigo Murilo por ter gentilmente me recebido em sua casa durante o treinamento em Botucatu;

A todos os participantes, que voluntariamente aceitaram participar da pesquisa;

Aos amigos que mediarão o contato com os participantes;

“Todo dia o sol levanta e a gente canta ao sol de todo o dia...”

Canto do povo de um lugar
(Caetano Veloso)

RESUMO

O uso de esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) tem crescido entre praticantes recreativos de musculação, com contribuições significativas dos *Designer Steroids* (DS), EAA projetados para fins de hipertrofia muscular em indivíduos saudáveis. O uso abusivo de EAA em geral está associado a efeitos adversos, sendo um dos mais preocupantes o desenvolvimento de câncer. Tendo em vista que o câncer é uma doença genética resultante de alterações em genes críticos na manutenção da estabilidade genômica e do controle da proliferação e diferenciação, biomarcadores capazes de identificar estas alterações podem assumir valor preditivo e contribuir para diminuição das altas taxas de morbidade e mortalidade por esta doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (MNCtB) em linfócitos humanos na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer em usuários de EAA. Foram coletados 5ml de sangue de 15 usuários de EAA praticantes de musculação (Grupo I), 20 não usuários praticantes de musculação (Grupo II) e 20 não usuários sedentários (Grupo III). Foi realizada cultura de linfócitos com o bloqueio da citocinese e posterior processamento para confecção de lâminas. A análise de MN foi realizada em um mínimo de 1000 linfócitos binucleados. A ocorrência de MN foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos indivíduos do Grupo I comparados aos do Grupo II e Grupo III. Os resultados apontam para a sensibilidade do MNCtB na identificação de danos cromossômicos decorrentes do uso de EAA. Estudos subsequentes para determinar seu potencial preditivo para o risco de câncer em usuários de EAA são necessários.

Palavras-chave: Esteroides Anabolizantes. Micronúcleo. MNCtB. Genotoxicidade

ABSTRACT

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) has grown among practitioners of recreational bodybuilding, with significant contributions of "Designer Steroids" (DS), EAA designed aiming muscle hypertrophy in healthy subjects. The abusive use of AAS in general is associated with adverse effects, one of the most worrisome is cancer development. Given that cancer is a genetic disease resulting from changes in genes critical in maintaining genomic stability and in the control of proliferation and differentiation, biomarkers able to identify these changes can take predictive value and contribute to reducing the high rates of morbidity and mortality by this disease. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the Cytokinesis Block Micronucleus Test (CBMN) in human lymphocytes in identifying risk groups for cancer development in users of AAS. Was collected 5ml of blood from 15 AAS users bodybuilders (G1), 20 nonusers bodybuilders (G2) and 20 nonusers sedentary (G3). Lymphocytes were cultured with blocking of cytokinesis and subsequent processing for making slides. MN analysis was performed on a minimum of 1000 binucleated lymphocytes. The occurrence of MN was significantly higher ($p < 0.05$) in individuals of G1 compared to G2 and G3. The results indicate the sensitivity of CBMN in human lymphocytes in the identification of chromosomal damage in consequence of AAS using, however, further studies are needed to determine their potential to predict the cancer risk in users of AAS.

Keywords: Anabolic steroids. Micronucleus. CBMN. Genotoxicity.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 12 |
| 2.1 | ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS | 12 |
| 2.1.1 | Considerações Gerais | 12 |
| 2.1.2 | Alterações Estruturais | 14 |
| 2.1.3 | Uso terapêutico | 15 |
| 2.1.4 | Eficácia Anabólica | 16 |
| 2.1.5 | Epidemiologia dos Esteroides Anabolizantes Androgênicos | 17 |
| 2.1.6 | <i>Designer Steroids</i> | 18 |
| 2.2 | USO ABUSIVO E EFEITOS ADVERSOS | 20 |
| 2.2.1 | Câncer | 21 |
| 2.3 | DANOS GENÉTICOS E CÂNCER | 22 |
| 2.3.1 | O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese | 23 |
| 2.4 | DANOS GENÉTICOS E ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS | 25 |
| 3 | OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 | OBJETIVO ESPECÍFICO | 27 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 | GRUPOS AMOSTRAIS | 28 |
| 4.2 | MÉTODO | 28 |
| 4.2.1 | Caracterização da amostra | 28 |
| 4.2.2 | Obtenção do material para estudo citológico | 28 |
| 4.2.3 | Preparações citológicas: cultura a partir de sangue total | 29 |
| 4.2.4 | Análise de micronúcleo | 29 |
| 4.2.5 | Análise Estatística | 30 |
| 4.2.6 | Aspectos Éticos | 31 |
| 5 | RESULTADOS | 32 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA | 32 |
| 5.1.1 | Idade | 32 |
| 5.1.2 | Consumo de bebida alcoólica | 32 |
| 5.1.3 | Prática de exercícios físicos | 33 |
| 5.1.4 | Anabolizantes e padrões de uso | 33 |
| 5.2 | ANÁLISE CITOGENÉTICA | 34 |
| 6 | DISCUSSÃO | 36 |
| 7 | CONCLUSÕES | 41 |
| | REFERÊNCIAS | 42 |
| | APÊNDICES | 54 |
| | ANEXO | 59 |

1. INTRODUÇÃO

Os Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAA) são derivados sintéticos do hormônio testosterona, manufaturados para maximizar o efeito anabolizante e minimizar o efeito androgênico (BELL; MAYCOCK; MCLEAN, 1998; MOTTRAM; GEORGE, 2000; KICMAN, 2008). A atividade anabólica da testosterona e seus derivados sintéticos resultam em ganhos significativos de massa muscular e força (BHASIN *et al.*, 1996; SATOH; GOTOH; YAMASHITA, 2000; SINHA-HIKIM, 2002; ERIKSSON *et al.*, 2005), devido ao aumento na retenção de nitrogênio, síntese de proteínas nas células do músculo esquelético e diminuição do catabolismo (CELOTTI; CECI, 1992; KUHN, 2002; GEORGE, 2003).

Inicialmente desenvolvidos para fins terapêuticos, como no tratamento do hipogonadismo em homens ou na reversão do estado catabólico presente em algumas síndromes (SHAHIDI, 2001; KICMAN; GOWER, 2003; EVANS, 2004), atualmente as maiores prevalências do uso dos EAA estão entre atletas, que buscam a melhoria no desempenho durante a prática esportiva, e praticantes recreativos de musculação, motivados pela construção de uma imagem corporal que os satisfaçam (SILVA; MOREAU, 2003; KOKKEVI *et al.*, 2008; IRIART; CHAVES; ORLEANS, 2009; POPE; KANAYAMA; HUDSON, 2012). Evidências epidemiológicas apontam alta prevalência do uso ilícito destas drogas nos Estados Unidos (JOHNSTON *et al.*, 2011), Austrália (DUNN; WHITE, 2011), Reino Unido, Grécia, Bulgária, Croácia (KOKKEVI *et al.*, 2008) e segundo dados do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CARLINI *et al.*, 2010), em levantamento realizado sobre o consumo de drogas nas 27 capitais brasileiras, 1,4% dos estudantes brasileiros já admitiram terem utilizado EAA alguma vez na vida, crescimento preocupante de 40% em relação ao levantamento realizado anteriormente (GALDURÓZ *et al.*, 2004). Como agravante, o surgimento dos *Designer Steroids* (DS), EAA projetados para fins de hipertrofia muscular em atletas e praticantes de musculação e comercializados como suplementos nutricionais em lojas pela internet, tem aumentado a incidência do uso de EAA devido à facilidade de obtenção e aos preços mais acessíveis destas drogas em comparação aos derivados sintéticos tradicionais (SHIPLEY, 2005; VAN EENO; DELBEKE, 2006; SCARTH *et al.*, 2010; KAZLAUSKAS, 2010; LOOTEN *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2013).

O efeito anabólico da testosterona e seus derivados é dose-dependente e o aumento significativo do tamanho do músculo e da força somente ocorre com doses de 300 mg por

semana ou mais (BHASIN *et al.*, 1996; BHASIN *et al.*, 2001) quantidades muito superiores as doses clínicas (SHAHIDI, 2001). Assim, a alta prevalência do uso destas drogas configura-se como um problema social e de saúde pública, pois o uso abusivo está associado a efeitos adversos, sendo os mais frequentes alterações: cardiovasculares (FANTON *et al.*, 2009; ISMAIL *et al.*, 2012); hepáticas (WELDER, ROBERTSON; MELCHERT, 1995; BOADA *et al.*, 1999; KAFROUNI; ANDERS; VERMA, 2007); sexuais (TAN; SCALLY, 2009); comportamentais e psiquiátricas (CLARK; HENDERSON, 2003; MELLONI; RICCI, 2010). Dentre os efeitos reportados um dos mais preocupantes é o desenvolvimento de câncer (JOHNSON *et al.*, 1972; CREAMER; RUBIN; EVANS, 1988; KOSAKA *et al.*, 1996; MARTORANA *et al.*, 1999; HARDT, 2012).

O câncer resulta de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA, apoptose e com o controle da proliferação e diferenciação celular e que levam ao crescimento desorganizado e à perda da capacidade celular em evoluir para a morte por apoptose. O acúmulo destas alterações genéticas é possível diante de um quadro de instabilidade genômica, característico das etapas iniciais do processo carcinogênico (BECKMAN; LOEB, 2005). A exposição a agentes genotóxicos podem levar a mutações de ponto e alterações cromossômicas, numéricas e/ou estruturais, que favorecem a evolução para este quadro de instabilidade (BONASSI, 2011). Biomarcadores que possibilitem identificar estas alterações assumem, assim, importância na determinação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer, e o seu uso, como medida de prevenção, pode ser uma estratégia efetiva na diminuição das altas taxas de morbidade e mortalidade observadas por esta doença em todo o mundo. Entre os testes citogenéticos que fazem uso de biomarcadores de genotoxicidade, o Teste de Micronúcleo é amplamente empregado na avaliação da exposição humana a agentes potencialmente genotóxicos (LONCAR *et al.* 2004; TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010; SOUZA; CERQUEIRA; MEIRELES, 2013) e no biomonitoramento de grupos sob risco de desenvolvimento do câncer (CERQUEIRA *et al.*, 1998; EL-ZEIN *et al.*, 2006; BONASSI, *et al.*, 2007; IAMARCOVAI *et al.*, 2008; CHANG; LI; LI, 2010).

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular (FENECH, 2007). Refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos e, segundo Bonassi *et al.* (2007), são efetivos marcadores de risco de câncer. O Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos é um dos métodos mais comumente utilizados,

particularmente quando realizado com o bloqueio da citocinese_ Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (FENECH, 2000, 2007).

A alta confiabilidade e sensibilidade da técnica, fazem com que este ensaio seja constantemente utilizado no monitoramento genotóxico de populações, onde tem se revelado eficaz na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer (FENECH, 2002, 2007; BONASSI *et al.*, 2007; IARMARCOVAI *et al.*, 2008; CHANG; LI; LI, 2010; EL-ZEIN; VRAL; ETZEL, 2011). Diversos estudos em que se fez uso de marcadores de genotoxicidade têm apontado para a capacidade dos EAA em induzir alterações no material genético, o que poderia explicar a associação entre câncer e uso destes esteroides (JOOSTEN, 2004; TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007; KAYANI; PARRY, 2007; DORN *et al.*, 2008a, 2008b; MARTINS *et al.*, 2010). Entre os mecanismos apontados para a genotoxicidade dos EAA incluem-se sua aromatização e conversão em 17-beta-estradiol, agente mutagênico e carcinogênico (LIEHR, 2000; JOOSTEN, 2004).

Tendo em vista o uso cada vez mais frequente de EAA e a possível associação entre estas drogas, dano genético e câncer, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso do Teste MNcTb em linfócitos humanos como biomarcador de risco de câncer em usuários de EAA, buscando uma estratégia efetiva na prevenção desta doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

2.1.1 Considerações Gerais

Os Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona (Figura 1), hormônio esteroide de ocorrência natural sintetizado no corpo humano a partir do colesterol, assim como todos os hormônios esteroides (BELL; MAYCOCK; MCLEAN, 1998; MOTTRAM; GEORGE, 2000). A testosterona exerce ações anabolizantes e androgênicas em uma grande variedade de estruturas andrógeno-sensíveis que incluem os órgãos sexuais acessórios, sistema nervoso central, rim, fígado e músculos. Os efeitos androgênicos são responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo masculino e das características sexuais secundárias, respectivamente na fase embrionária e durante a puberdade, e pela manutenção das funções reprodutivas na fase adulta (SHAHIDI, 2001; EVANS, 2004; KICMAN, 2008). A ação miotrófica da testosterona é responsável por grande retenção de nitrogênio, o que define o efeito anabolizante deste hormônio (CELOTTI; CESI, 1992).

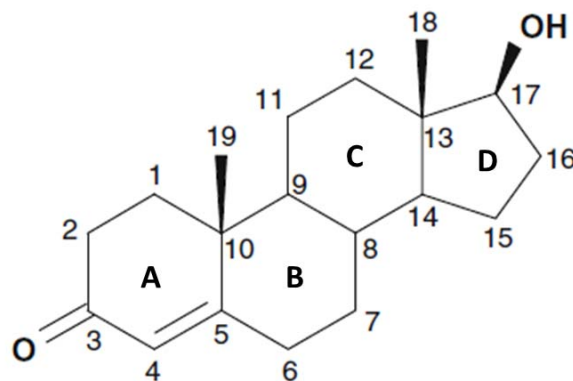


Figura 1: Molécula da testosterona.

Fonte: KAZLAUSKAS, 2010

Apesar da ampla diversidade de ações biológicas dos andrógenos, é surpreendente notar que exista apenas uma única espécie de receptor androgênico, com um modo singular de ação_ ativação transcricional por elementos de resposta androgênicos em diferentes genes-alvo (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002; BHRKE; YESALIS, 2004). Alguns aspectos da especificidade tecidual da ação androgênica podem ser explicados pela conversão local da testosterona em metabólitos mais ativos ou mais específicos (WU, 1997). Por exemplo, é bem conhecido que em estruturas reprodutivas e no cérebro a testosterona não atua em sua conformação molecular original, mas é convertida em metabólitos ativos através da ação de duas diferentes enzimas: 5-alfa-redutase e aromatase (CELOTTI; CESI, 1992).

A enzima 5-alfa-redutase encontra-se presente em quase todas as estruturas andrógeno-dependentes e é responsável por catalisar a conversão da testosterona para 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT). A DHT se liga de duas a seis vezes com mais afinidade ao receptor androgênico do que a testosterona e representa um mecanismo de amplificação do sinal androgênico o qual é necessário para o normal desenvolvimento e manutenção das estruturas reprodutivas. A enzima aromatase, mais restrita a alguns órgãos, catalisa a conversão da testosterona para o estradiol, envolvido em atividades estrogênicas (MOTTRAM; GEORGE, 2000; EVANS, 2004; KICKMAN, 2008).

Nas células do tecido muscular este complexo enzimático apresenta baixa atividade, e a testosterona exerce seus efeitos agindo em sua conformação molecular nativa, o que distingue o músculo de outras estruturas andrógeno-sensíveis. A pequena quantidade de receptores androgênicos e os baixos níveis de DHT intracelular tornam o músculo esquelético pouco sensível à ação de andrógenos. Tendo em vista que este é o tecido-alvo primário dos efeitos anabólicos, os EAA são manufacturados primariamente para maximizar os efeitos anabólicos sobre os músculos e reduzir no organismo os efeitos associados à conversão para o DHT e a aromatização para o estradiol, pois resultam, respectivamente, na diminuição da relação anabólico/androgênica e no aumento de efeitos adversos associados à feminilização (CELOTTI; CESI, 1992; KUHN, 2002).

Entre os EAA a nandrolona (19-nortestosterona) foi um dos primeiros sintetizados, é o mais utilizado e estudado, e diferencia-se da testosterona apenas pela ausência de um grupo metil (CH_3) na posição C-19 (CELOTTI; CESI, 1992; MOTTRAM; GEORGE, 2000). A nandrolona fornece uma via de entendimento de como é possível aumentar os efeitos anabólicos e negligenciar os efeitos androgênicos com modificações estruturais relativamente simples.

A nandrolona é um bom substrato para a enzima 5-alfa-redutase, assim como a testosterona, sendo o principal metabólito desta reação a 5-alfa-diidronandrolona (DHN). Diferentemente do que ocorre com a testosterona a ação da 5-alfa-redutase não amplifica o sinal androgênico, pois o metabólito ativo (DHN) possui baixa afinidade com o receptor androgênico quando comparado ao metabólito da testosterona (DHT), o que resulta em uma reduzida ação androgênica nos tecidos sensíveis (Figura 2). Ao mesmo tempo, a nandrolona em sua conformação molecular nativa tem mais afinidade ao receptor androgênico, levando a uma ação aumentada deste hormônio no músculo esquelético. Como resultado a nandrolona passa a ser significativamente mais anabólica e menos androgênica do que a testosterona (CELOTTI; CESI, 1992; KICMAN, 2008).

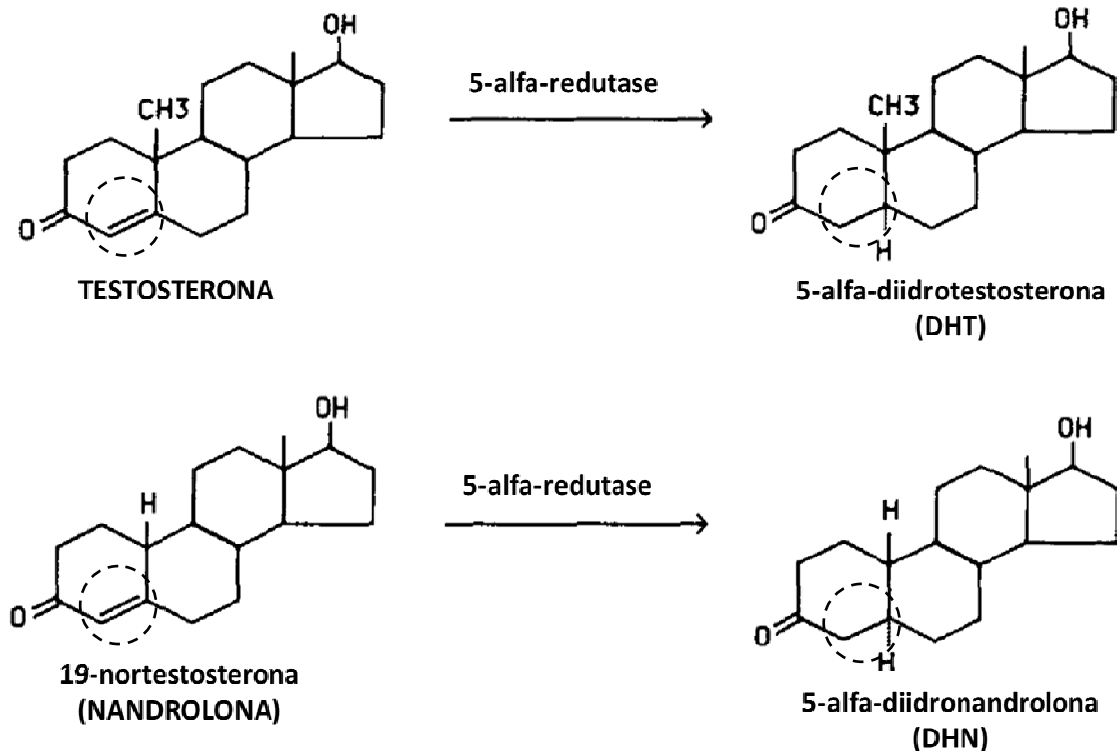


Figura 2: Conversão da testosterona e da nandrolona pela 5- α -redutase.

Fonte: Adaptado de Celotti e Cesi (1992).

2.1.2 Alterações estruturais

O aumento da eficácia anabólica pode ser obtido através de outras modificações estruturais na molécula da testosterona que resultam em um grande número de derivados

sintéticos. Dentre as alterações existentes a 17-alfa-alquilação, que consiste na adição de um grupo metil (CH₃) na posição C-17, é uma das mais comumente observadas. Encontrada em EAA como a oxandrolona (ANAVAR[®]) e o estanozolol (WINSTROL[®]), esta alteração promove uma diminuição na taxa de inativação hepática importante para atividade oral destes derivados, visto que, a testosterona é relativamente susceptível à rápida degradação pelo fígado quando administrada oralmente e, por isso, ineficaz na promoção dos efeitos desejados nos tecidos-alvo (KICMAN; GOWER, 2003; EVANS, 2004; KICMAN, 2008).

Outra modificação presente em muitos EAA, como o cipionato de testosterona (DEPOSTERON[®]) e o propionato de testosterona (um dos componentes do DURATESTON[®]) é a esterificação do grupo hidroxila na posição C-17 com uma longa cadeia de hidrocarbonetos. A 17-beta-esterificação previne a rápida absorção destas moléculas do veículo oleoso levando a uma gradual e lenta liberação na circulação, o que prolonga os efeitos destes EAA (EVANS, 2004; KICMAN, 2008).

A esterificação do grupo hidroxila da nandrolona, EAA citado anteriormente, produz derivados que são mais estáveis e mais anabólicos, a exemplo do decanoato de nandrolona (DECA-DURABOLIN[®]). Os EAA deste grupo são ativos apenas se injetados (MOTTRAM; GEORGE, 2000; KICMAN; GOWER, 2003; EVANS, 2004; KICMAN, 2008). Modificações diversas nos anéis A, B e C da testosterona conferem também vantagens do ponto de vista da eficácia farmacológica como retardo em seu metabolismo, aumento da afinidade com o receptor androgênico, aumento da resistência à aromatização para o estradiol e diminuição da afinidade dos metabólitos ao receptor androgênico (KUHN, 2002).

2.1.3 Uso terapêutico

Os EAA foram originalmente desenvolvidos para o tratamento do hipogonadismo em homens, atraso da puberdade e promoção do crescimento, sendo atualmente também utilizados no tratamento de outras condições, como infecção pelo HIV e câncer (quando levam a um quadro de caquexia), queimaduras graves, anemia, insuficiência hepática e renal e angioedema hereditário (SHAHIDI, 2001; KICMAN; GOWER, 2003; CLARK; HENDERSON, 2003; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; KICMAN, 2008).

2.1.4 Eficácia anabólica dos EAA

A eficácia dos EAA na promoção do anabolismo durante tratamento de indivíduos que apresentam níveis subfisiológicos do hormônio testosterona, a exemplo de alguns citados acima, é consensual na literatura (BHASIN *et al.*, 1997; SNYDER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000). Entretanto a mesma eficácia em níveis suprafisiológicos deste hormônio, obtidos quando indivíduos saudáveis, como atletas ou praticantes de musculação, fazem uso de EAA, não está bem estabelecida (DZAMUKOV; VALIULLIN, 1998; FILHO *et al.*, 2006). Celotti e Cesi (1992) em revisão sobre os efeitos dos EAA nos músculos apontam grande controvérsia entre estudos que investigaram ganhos de massa muscular em indivíduos saudáveis após a administração de EAA. Segundo os autores, parte desta controvérsia deve-se a dificuldade dos estudos em atingir um número de participantes adequado e controlar variáveis como: tipo e doses de EAA; programa de treinamento de força e dieta.

Bhasin *et al.* (1996), realizaram estudo em que foi investigado os efeitos do EAA enantato de testosterona porém, com especial atenção na padronização de variáveis importantes. Este EAA foi administrado a 40 homens saudáveis em doses de 600 mg/semana, durante dez semanas de treinamento de força em que foram observados os efeitos na massa magra, tamanho muscular e força destes indivíduos. As variáveis, intensidade, tipo e duração do treinamento bem como, a ingestão nutricional foram padronizados e os participantes acompanhados durante o curso da pesquisa. Os resultados encontrados mostraram que doses suprafisiológicas da testosterona, especialmente quando combinadas com treinamento de força, aumentam significativamente a massa magra (média de 6,1 Kg em dez semanas), o tamanho muscular, e a força, em homens saudáveis.

Resultados similares foram encontrados por Bhasin *et al.* (2001), porém em investigação na qual foi incluída uma faixa mais extensa de concentrações séricas de enantato de testosterona, que variou desde níveis subfisiológicos, obtidos a partir da supressão da testosterona endógena de indivíduos saudáveis pela administração de um agonista para o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), até concentrações suprafisiológicas, com a administração de doses progressivas deste EAA durante 20 semanas. Os 61 homens participantes tiveram dietas padronizadas e não realizaram qualquer treinamento de força durante a pesquisa. Os resultados obtidos revelaram que o aumento da testosterona circulante resulta também em um aumento dose-dependente da massa magra, tamanho muscular e força, e que a relação entre as concentrações de testosterona circulante e alterações na massa

muscular e no tamanho muscular ocorre através de uma curva dose-resposta única sugerindo que o anabolismo promovido pela testosterona tanto em níveis subfisiológicos quanto em níveis suprafisiológicos ocorra através de um único mecanismo de ação.

2.1.5 Epidemiologia dos Esteroides Anabolizantes Androgênicos

Após a introdução dos EAA como agentes terapêuticos, foi percebido por atletas que os mesmos poderiam elevar os ganhos de massa muscular a níveis superiores aos obtidos naturalmente, possibilitando assim um aumento de rendimento em suas práticas esportivas. Esta percepção difundiu seu uso entre eles, que passaram a representar na época a maior prevalência de uso destas drogas (FITZPATRICK, 2002). Os EAA permaneceram sob domínio da elite atlética e de fisiculturistas competitivos, que mantiveram em segredo essa prática, não a divulgando para o público em geral (KANAYAMA *et al.*, 2010). O aparecimento de uma série de guias para o uso de EAA, começando pelo *Duchaine's Underground Steroid Handbook*, em 1981, oferecendo informações detalhadas sobre os EAA e sua administração, aumentou a popularização dos EAA e seu uso ampliou-se para além do tratamento clínico e das práticas esportivas. A disponibilidade de informação, juntamente com o crescente culto ao corpo na sociedade contemporânea, popularizou os EAA principalmente entre os jovens que passaram a utilizá-los para fins estéticos (DUCHAINE, 1981; PHILIPS, 1985; IRIART; CHAVES; ORLEANS, 2009; KANAYAMA *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos realizados em diversos países do mundo têm revelado taxas de prevalência significativas quanto ao uso de EAA. Nos Estados Unidos um monitoramento realizado em 2010 pelo Instituto Nacional de Saúde (JOHNSTON *et al.*, 2011) com 15.100 adolescentes, encontrou, para o sexo masculino, prevalência de 2,5% no uso de EAA. Estudo realizado por Kokkevi *et al.* (2008) em países da Europa (Reino Unido, Grécia, Bulgária, Croácia, Chipre, Eslováquia) com adolescentes de 16 anos de idade, revelou prevalência que variou de 2,2% a 4,4% quanto ao uso de EAA alguma vez na vida.

O Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) em levantamento nacional feito com 50.890 estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino das 27 capitais brasileiras encontrou uma prevalência de 1,4% quanto ao uso de EAA alguma vez na vida, um aumento de 40% em relação ao levantamento realizado anteriormente (GALDURÓZ *et al.*, 2004; CARLINI *et al.*, 2010). Neste mesmo

estudo quando observado apenas os estudantes acima 19 anos a prevalência aumentou para 3,3%. Tendo em vista que esta faixa etária não é a de maior incidência do uso destas drogas, os dados obtidos por este levantamento podem apontar uma realidade ainda mais preocupante. Silva e Moreau (2003) em pesquisa desenvolvida no Brasil com 209 praticantes de academia da cidade de São Paulo observaram uma incidência de 19% do uso de EAA, sendo que do total de usuários, 46% tinham idades entre 25 e 29 anos e apenas 5% tinham menos de 20 anos.

Segundo Iriart, Chaves e Orleans (2009), em estudo que traçou o perfil de usuários de EAA que frequentavam academias de Salvador, a principal motivação para início da prática foi a busca de um corpo ideal, adequado aos padrões valorizados na sociedade contemporânea e difundidos pela mídia. Kanayama, Hudson e Pope (2010) em revisão sobre o uso ilícito de EAA afirmam, com base em diversos estudos epidemiológicos sobre o tema, que, de maneira geral, pelo menos 3% dos jovens do sexo masculino na maioria dos países ocidentais já utilizaram EAA alguma vez em suas vidas.

2.1.6 Designer Steroids

O número de esteroides anabolizantes disponíveis no mercado tem crescido devido a introdução de novos esteroides por empresas não-farmacêuticas (SEKERA *et al.*, 2005; LOOTENS *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2013). Fazem parte deste grupo os *Designer Steroids* (DS), EEA “projetados” para fins de hipertrofia muscular em indivíduos saudáveis como atletas e praticantes de musculação, e que têm sua estrutura química baseada em alguns EAA anteriormente comercializados, porém com pequenas modificações que os tornam muitas vezes indetectáveis por espectrometria de massa, técnica utilizada por agências antidoping na detecção de substâncias ilegais (YUAN; FORMAN, 2005; VAN EENO; DELBEKE, 2006; BROWN; VUKOVICH; KING, 2006; SCARTH *et al.*, 2010). Os DS são sintetizados ou para fugir deliberadamente da detecção por exames ou, o que é mais comum, para que sejam comercializados livremente na internet por um período, visto que inicialmente suas estruturas não se enquadram no âmbito das normas legais que impedem a venda de produtos esteroides definidos (VAN EENO; DELBEKE, 2006; KAZLAUSKAS, 2010).

A 17-metildrostanolona (2 α ,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one) é um DS sintetizado a partir de um conhecido EAA, a drostanolona, (17 β -hydroxy-2 α -methyl-5 α -

androstan-3-one) e diferencia-se desta apenas pela presença de um grupo metil na posição C-17, o que lhe confere atividade via administração oral, como discutido anteriormente (Figura 3). A metildrostanolona, conhecida também como metasterona, apesar de fazer parte da lista de substâncias proibidas da Agência Mundial Antidoping (WADA) desde 2006 continua sendo comercializada como suplemento nutricional (WADA, 2006; GAUTHIER *et al.*, 2009; LOOTENS *et al.*, 2011).

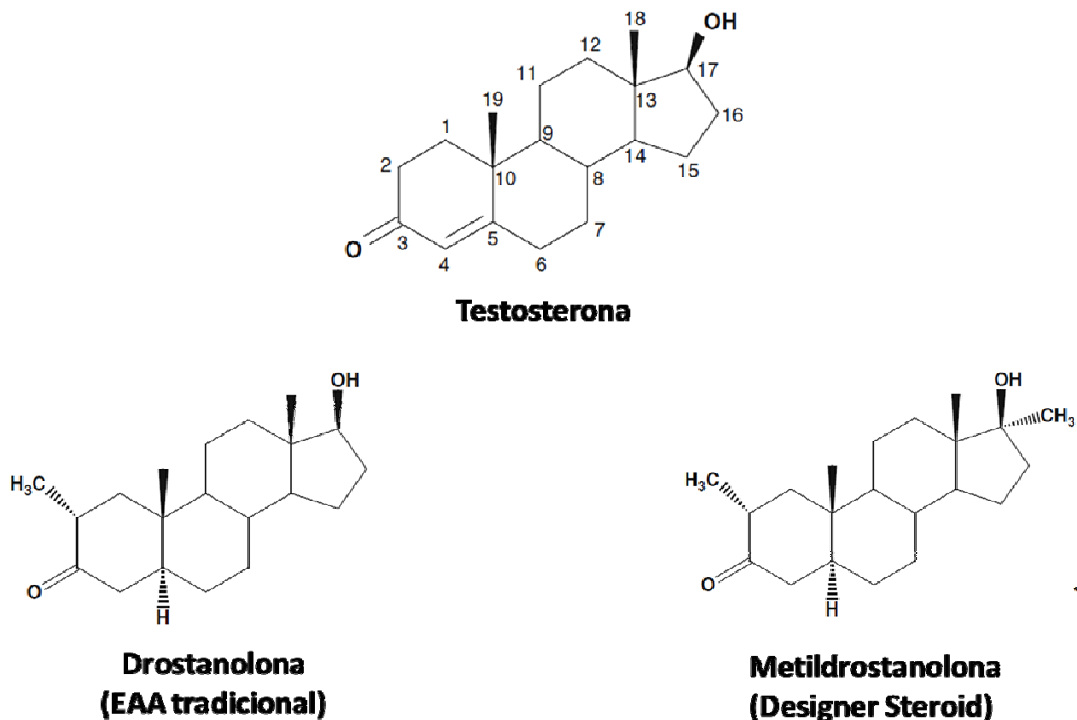


Figura 3: Comparação entre as moléculas da testosterona, drostanolona e metildrostanola.
Fonte: Adaptado de Kazlauskas (2010).

Lootens *et al.* (2011) analisaram pílulas de um DS, obtido em sites da internet, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e confirmaram a presença da metildrostanolona em altas quantidades, assim como constava na bula do “suplemento”. Em seguida realizaram estudos de excreção utilizando camundongos com hepatócitos humanos transplantados com o objetivo de melhorar o entendimento a respeito do metabolismo deste esteroide anabolizante e avançar no controle antidoping.

Outros EAA fazem parte do grupo dos DS como a metilstenbolona (2,17 α -dimethyl-17 β -hydroxy-5 α -androst-1-en-3-one), sintetizada a partir do EAA stenbolona

(CAVALCANTI *et al.*, 2013) e o Madol (17 α -methyl-5 α -androst-2-en-17 β -ol) obtido através da metilação do 5 α -androst-2-en-17-one (SEKERA *et al.*, 2005).

Os esteroides anabolizantes legalmente comercializados são produzidos por fabricantes farmacêuticos para uso médico e passam por estudos de múltiplas etapas para provar a sua eficácia e segurança (CIMINO, 2006). Os DS, como não estão disponíveis no mercado como drogas aprovadas, não passaram pela bateria de testes exigida para o uso em humanos e, assim, muito pouco se sabe a respeito de suas propriedades toxicológicas. As companhias químicas responsáveis pela produção dos DS podem vendê-los por preços muito mais acessíveis comparados aos EAA tradicionais, já que os dispendiosos estudos farmacológicos e toxicológicos necessários para a produção e comercialização de um fármaco são negligenciados (VAN EENO; DELBEKE, 2006; KAZLAUSKAS, 2010).

A eficácia anabólica destas drogas muitas vezes é obtida ignorando-se a gravidade dos efeitos adversos associados. Um dos primeiros DS lançados foi a Norboletona (CATLIN, AHRENS e KUCHEROVA, 2002), um EAA 16,3 vezes mais anabólico do que a metiltestosterona, porém, apesar da promissora dissociação dos efeitos anabólicos e androgênicos, nunca foi comercializada no mercado legal de drogas devido a sua alta toxicidade. O madol, EAA patenteado em 1961, nunca foi aprovado pela FDA, porém, foi detectado em 2004 por um grupo de pesquisadores através de uma investigação com DS (SEKERA *et al.*, 2005).

2.2 USO ABUSIVO E EFEITOS ADVERSOS

As altas doses e o tempo prolongado, característicos do uso de EAA entre atletas e praticantes de musculação, tornam estes grupos mais suscetíveis ao aparecimento de efeitos adversos (AMSTERDAM; OPPERHUIZEN; HARTGENS, 2010). Tais efeitos incluem alterações: 1) cardiovasculares, como, arteriosclerose, hipertensão e hipertrofia cardíaca (SULLIVAN *et al.*, 1998; SADER *et al.*, 2001; FANTON *et al.*, 2009; ISMAIL *et al.*, 2012); 2) hepáticas, como adenomas hepáticos, benignos e carcinomas (CREAGH; RUBIN; EVANS, 1988; WELDER; ROBERTSON; MELCHERT, 1995; BOADA *et al.*, 1999; KAFROUNI; ANDERS; VERMA, 2007); 3) sexuais, como, atrofia testicular e oligospermia ou azoospermia, hipertrofia prostática, carcinoma da próstata, ginecomastia (ROBERTS; ESSENHIGH, 1986; TAN; SCALLY, 2009; MARAVELIAS *et al.*, 2005; CASAVANT,

2007; FANTON *et al.*, 2009; AMSTERDAM; OPPERHUIZEN; HARTGENS, 2010) e; 4) psiquiátricas e comportamentais, como irritabilidade, euforia, depressão e psicose (CLARK; HENDERSON, 2003; MELLONI; RICCI, 2010).

A faixa extensa de efeitos adversos observada, decorrente do uso de EAA, reflete o número de estruturas andrógeno-sensíveis e torna difícil encontrar uma relação custo-benefício favorável no uso destas drogas. Eklof *et al.* (2003) realizaram estudo que incluiu 4.339 usuários de EAA entre os anos de 1996 e 2000. Os dez efeitos adversos mais comumente observados por estes pesquisadores foram agressividade (835), depressão (829), acne (770), ginecomastia (637), ansiedade (637), impotência sexual (413), atrofia testicular (404) e distúrbios do sono (328).

Kafrouni, Anders e Verna (2007) em estudo de caso reportaram o desenvolvimento de grave lesão hepática colestática em dois jovens após o consumo do DS metildrostanolona. Sha *et al.* (2008) também descreveram cinco casos de hepatotoxicidade em que houve o surgimento de lesão hepática colestática em cinco usuários do DS metildrostanolona.

2.2.1 Câncer

A associação entre uso abusivo de EAA e o desenvolvimento de câncer também tem sido relatada, e é motivo de preocupação. Estudo de caso realizado por Kosaka *et al.* (1996) reportou o surgimento de carcinoma hepatocelular em indivíduo que fazia uso terapêutico do EAA oximetolona durante três anos em doses diárias de 60 mg. Os mesmos autores (KOSAKA *et al.*, 1996), em revisão de literatura sobre o tema, registraram na população japonesa, entre 1976 e 1995, 13 casos em que houve o surgimento de carcinomas hepatocelulares decorrentes também do uso prolongado de EAA para fins terapêuticos. O mesmo tipo de neoplasia foi observado por Hardt *et al.*, (2012) em um jovem fisiculturista profissional que fez uso abusivo de EAA por um período de cinco anos. Além destes, outros estudos de caso sugerem associação entre EAA e desenvolvimento de câncer hepático (JOHNSON *et al.*, 1972; STROMEYER; SMITH; ISHAK, 1979; GLESSON *et al.*, 1991).

Existem relatos também da ocorrência de câncer em outros tecidos associado com o uso abusivo de EAA, como reportado por Martorana *et al.* (1999) que observaram o surgimento de carcinoma renal em fisiculturista usuário de EAA. Este usuário fez uso simultâneo do propionato de testosterona, estanozolol e metenolona por um período de 15

anos. A associação entre câncer renal e abuso de EAA foi reportada por outros estudos (PRAT *et al.*, 1977; BRONSON; MATHERNE, 1997). Há registro também do desenvolvimento de câncer de próstata em usuário de EAA (ROBERTS; ESSENHIGH, 1986).

Como observado há evidências de que o uso abusivo de EAA esteja associado ao desenvolvimento de câncer em alguns casos, principalmente no câncer hepático e renal, porém os mecanismos envolvidos nesta promoção carcinogênica dos EAA ainda são pouco compreendidos, e foram pouco discutidas pelos autores.

2.3 DANOS GENÉTICOS E CÂNCER

O câncer é resultante de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA, e com o controle da proliferação e diferenciação celular que levam ao crescimento desorganizado e à perda da capacidade celular em evoluir para a morte por apoptose. A multiplicidade de alterações genéticas observadas em células durante a evolução do processo de transformação maligna, não pode ser explicada com base apenas nas taxas de mutação espontânea (aquelas ocorridas na presença somente de fatores endógenos) exigem, assim, outros eventos associados à promoção de alterações genéticas (LOEB, 1991; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). A exposição à mutágenos exógenos, a exemplo dos carcinógenos presentes na fumaça do cigarro, aflatoxinas produzidas por fungos e várias formas de radiação, tem participação relevante na etiologia da doença, pois tais agentes interagem direta ou indiretamente com a molécula de DNA podendo levar a mutações de ponto e alterações cromossômicas, estruturais ou numéricas, que aumentam as chances da célula evoluir para um quadro de instabilidade genômica característico de etapas iniciais do processo carcinogênico (BECKMAN; LOEB, 2005; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Biomarcadores associados a estes eventos podem ser ferramentas para a detecção precoce de mudanças relacionadas ao câncer.

A significância preditiva destes biomarcadores é definida por uma série de fatores os quais estão relacionados ao cumprimento de etapas de validação. A validação de um biomarcador pode ser resumida em três etapas: (1) desenvolvimento de protocolos padronizados que levem em conta aquisição e processamento da amostra e, ainda, análise do biomarcador; (2) avaliação cuidadosa de todos os aspectos que influenciam na variabilidade

do biomarcador na população humana como, variáveis demográficas, escolha do tecido-alvo, variáveis metodológicas; e finalmente (3) testes da sensibilidade e especificidade dos biomarcadores, através de estudos prospectivos associados a estudos de caso-controle, comparando-os e buscando relações entre estes biomarcadores e o risco de desenvolvimento da doença (BONASSI; NERI; PUNTONI, 2001; BONASSI; WILLIAM, 2002; FENECH, 2002). Nas últimas duas décadas, testes que identificam biomarcadores citogenéticos têm alcançado grandes avanços no que tange ao cumprimento das etapas de validação citadas acima, entre os quais se destacam o clássico Teste de Aberrações Cromossômicas (BONASSI, 2000) e o Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (BONASSI *et al.*, 2001; BONASSI *et al.*, 2007) ambos em linfócitos humanos.

2.3.1 O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese

O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (MNCtB), conforme proposto por Fenech e Morley (1985), é o método preferencialmente utilizado para medir a frequência de micronúcleos (MN) em cultura de linfócitos humanos. MN são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular. Refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos.

No MNCtB as células que completaram uma divisão nuclear têm sua citocinese bloqueada devido ao uso da citocalasina B, inibidor da polimerização da proteína actina necessária para a formação do anel de microfilamentos responsável pela indução da contração do citoplasma e consequente clivagem da célula em duas células-filhas (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). A análise dos micronúcleos, desse modo, fica restrita a células com aparência binucleada, ou seja, aquelas que podem efetivamente expressá-los (Figura 4). A restrição a células binucleadas evita subestimativas da frequência de MN resultantes da contagem de células que não passaram por um ciclo de divisão e consequentemente não poderiam expressar estas estruturas. Assim, a metodologia possibilita a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir quanto a sua cinética de divisão e confere à técnica boa reprodutibilidade e confiabilidade, o que tem contribuído para a adoção do MNCtB como um dos testes citogenéticos padrão na genética toxicológica (FENECH, 2007).

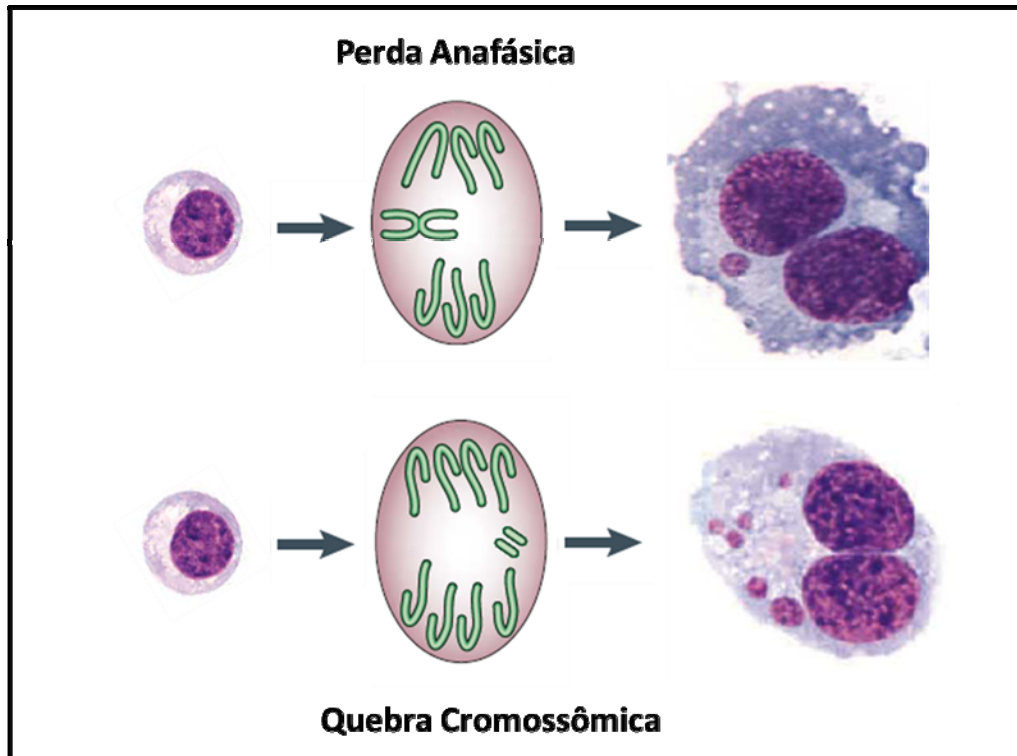


Figura 4: Formação de micronúcleos no MNCtB. **Fonte:** Adaptado de Fenech *et al.* (2003, 2007).

A grande abrangência no uso do MNCtB para a análise de MN em humanos tornou possível o lançamento de projeto colaborativo internacional envolvendo mais de 30 laboratórios intitulado *The Human Micronucleus (HUMN) Project*. Esta iniciativa possibilitou grandes avanços na validação do MN como biomarcador para o risco de câncer em humanos. O primeiro estudo desenvolvido através do projeto HUMN (BONASSI *et al.*, 2001) objetivou a elaboração de um banco de dados das frequências de MN em linfócitos de 6.583 sujeitos distribuídos por 25 laboratórios ao redor do mundo. Os dados foram analisados e comparados na busca de importantes variáveis demográficas, metodológicas e de exposição que poderiam influenciar na frequência de MN, mensurada pelo MNCtB. O entendimento destas variáveis possibilita o aumento da precisão do ensaio para a detecção de eventos genotóxicos, e uma maior confiança dos métodos de comparação entre diferentes indivíduos e populações, devido à menor variabilidade interlaboratorial.

O passo lógico seguinte levou ao desenvolvimento de novo estudo (BONASSI *et al.*, 2007), também integrado ao projeto HUMN, que avaliou diretamente a eficácia do teste de MN em linfócitos humanos na predição do risco de câncer. O estudo de coorte prospectivo envolveu a análise das frequências de MN em linfócitos de 6.780 indivíduos oriundos de investigações em 20 laboratórios entre os anos de 1980 e 2002. Os indivíduos foram

subdivididos em três grupos quanto à frequência de MN (baixa, média, e alta frequência) para padronizar as variáveis interlaboratoriais, e acompanhados posteriormente observando o desenvolvimento de câncer. A análise dos resultados revelou aumento significativo da incidência de todos os cânceres nos grupos de média e alta frequência de MN quando comparados ao grupo com baixa frequência. Os autores concluíram, com base nos resultados obtidos, que a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos pode ser preditiva do risco de câncer, e sugere a associação entre o aumento destas estruturas e eventos iniciais da carcinogênese. Este resultado foi corroborado por outros estudos independentes que também avaliaram a associação entre aumento da frequência de MN em linfócitos e o desenvolvimento de câncer (EL-ZEIN *et al.*, 2006; IAMARVOVAI *et al.*, 2008; CHANG; LI; LI, 2010).

Os avanços significativos obtidos na validação dos MN em linfócitos como biomarcadores do risco de câncer em humanos, somados aos baixos custos de implantação e rápida análise, que permitem sua aplicação em grande escala, tornam o MNCtB uma valiosa ferramenta no biomonitoramento de populações expostas a fatores de risco para o desenvolvimento de câncer possibilitando a implementação de políticas de prevenção, estratégia mais efetiva para a diminuição das altas taxas de morbidade e mortalidade por esta doença observadas em todo o mundo.

2.4 DANOS GENÉTICOS E ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

O potencial genotóxico dos hormônios esteroides tem sido alvo de investigações principalmente após estudos terem apontado relação entre seu uso e o desenvolvimento de câncer. Joosten *et al.* (2004), em revisão da literatura sobre a genotoxicidade dos hormônios esteroides, avaliaram estudos em que se fizeram uso de diferentes marcadores de dano genético. Dentre os 14 estudos em que foi avaliado o potencial genotóxico da testosterona e seus derivados, apenas dois foram positivos, enquanto 12 trabalhos não revelaram associação entre uso destas drogas e alteração genética.

Martelli *et al.* (2003) investigaram o potencial genotóxico de nove hormônios esteroides sexuais, dentre os quais quatro eram androgênicos (testosterona, metiltestosterona, estanozolol e oximetolona) em culturas primárias de hepatócitos humanos e de ratos,

utilizando como marcador a indução de reparo de DNA. Os resultados obtidos por estes autores, para os quatro hormônios androgênicos, foram inconclusivos.

Dorn *et al.* (2008a) observaram os efeitos do DS Madol e do pro-hormônio 19-norandrostenediona na frequência de MN em linhagem de células V79, derivadas de fibroblastos humanos. Os resultados revelaram uma frequência significativa destas estruturas nas linhagens tratadas com os hormônios esteroides. Holden, Studwell e Majeska (1999), entretanto, ao avaliarem o potencial genotóxico do EAA oximetolona, através de uma bateria de testes, incluindo, Teste de Micronúcleo em medula óssea de roedores e o Teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos, não encontraram associação positiva entre dano genético e frequência de MN.

Torres-Bugarín *et al.*, (2007), em estudo do tipo caso-controle, investigaram a genotoxicidade dos EAA em células esfoliadas da mucosa oral, relatando frequência de micronúcleos significativamente maior entre os usuários. Segundo os autores um possível mecanismo de ação para explicar a genotoxicidade observada destes agentes seria a conversão dos derivados da testosterona em 17-beta-estradiol, um conhecido agente mutagênico e carcinogênico (LIEHR, 2000). Utilizando a mesma metodologia, Martins *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes em usuários de DECA-DURABOLIN[®] (decanoato de nandrolona) e WINSTROL[®] (estanozolol) e assim como Torres-Bugarín *et al.* (2007) apontaram a conversão para 17-beta-estradiol como possível mecanismo envolvido.

A avaliação do potencial genotóxico dos EAA através do MNCtB tem registro na literatura apenas no estudo de Kayani e Parry (2007). Estes pesquisadores administraram o EAA trembolona em duas linhagens celulares, WILL3, de fibroblastos humanos, e MCL-5, linhagem derivada de linfoblastóides. Efeitos aneugênicos e clastogênicos da trembolona foram encontrados pelos autores. Não há registros na literatura da utilização do Teste MNCtB em linfócitos humanos de usuários de EAA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia do Teste de Micronúcleo com o Bloqueio da Citocinese (MNCtB) na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer em usuários de EAA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de danos genéticos, traduzidos como micronúcleos em usuários de EAA;
- Contribuir para a elucidação do potencial genotóxico dos EAA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 GRUPOS AMOSTRAIS

O presente estudo incluiu três grupos distintos:

- a) Grupo I: constituído por 15 indivíduos do sexo masculino praticantes de musculação que faziam uso de EAA;
- b) Grupo II: constituído por 20 indivíduos do sexo masculino praticantes de musculação que não faziam uso de EAA;
- c) Grupo III: constituído por 20 indivíduos do sexo masculino, sedentários e que não faziam uso de EAA.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Caracterização da amostra

Questionário contendo indagações a respeito da idade, consumo de tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas e exposição a agentes genotóxicos conhecidos foi aplicado à totalidade da amostra (apêndice I). Os usuários de EAA foram questionados sobre: (1) EAA utilizado (2) dose, frequência e duração do uso. Foram considerados como critérios de exclusão: (1) consumo de tabaco; (2) indivíduos que fizeram radiografias recente; (3) indivíduos que foram expostos a outros agentes sabidamente genotóxicos há menos de três meses.

4.2.2 Obtenção do material para estudo citológico

Os linfócitos foram obtidos a partir da coleta de cinco ml de sangue periférico dos participantes voluntários. Este procedimento foi realizado pela bióloga Luciana Alves da Cruz

no Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS (LAC) com o uso de uma seringa estéril heparinizada e em condições apropriadas para a prática.

4.2.3 Preparações citológicas: cultura de linfócitos a partir de sangue total

As amostras de sangue foram transportadas do LAC até o Laboratório de Genética Toxicológica (LABGENTOX) onde foram processadas de acordo com protocolo descrito por Fenech (2000). Decorrido um período de quatro horas pós-coleta, 0,5 ml de plasma e sete gotas de sangue da amostra foram adicionados a frascos de cultura contendo 4,5 ml de RPMI, 1 ml de soro fetal bovino e 150 µl de fitohemaglutinina. O meio de cultura com a amostra foi então incubado a 37°C com 5% CO₂. Após 44 horas foram adicionados 18 µl de citocalasina B (6µg/ml) ao meio mantendo o frasco de cultura na incubadora por mais 28 horas. No final das 72 horas a cultura foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada a 800 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se à suspensão de células solução hipotônica gelada (KCL 0,075 M) e foi realizada mais uma vez a centrifugação. Após o descarte do sobrenadante houve a adição do fixador metanol/ácido acético em três momentos. Primeiro, na proporção de 5:1 com o acréscimo de 3 gotas de formaldeído seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante, depois, na proporção de 3:1, o qual se repetiu mais uma vez, com nova centrifugação e descarte ao término de cada adição. O precipitado final, após ressuspensão, foi gotejado em lâmina de vidro. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5%, por 5 minutos.

4.2.4 Análise de micronúcleo

A análise dos micronúcleos foi realizada em um mínimo de mil células binucleadas, sob microscopia óptica, com aumento mínimo de 200X, e em teste cego quanto aos dados do questionário. Para identificação dos micronúcleos (Figura 5) foram adotados os critérios descritos por Fenech (2000).

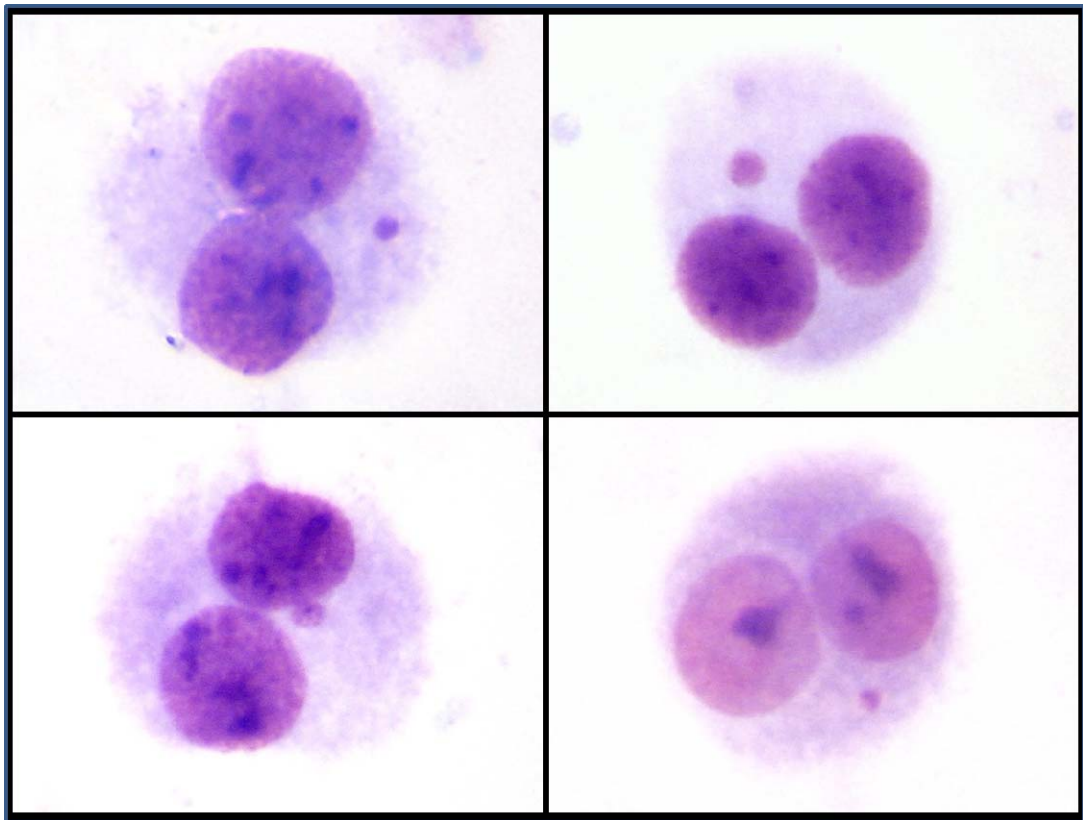


Figura 5: Fotomicrografias de células com micronúcleos observadas durante a análise citogenética

4.2.5 Análise estatística

Para avaliação da variável quantitativa idade, foi empregada a ANOVA. Toda a análise relativa à ocorrência de micronúcleos foi realizada com o uso do Teste Condicional para Comparação de Proporções em Situações de Eventos Raros, que é um teste de significância alternativo ao Teste de Qui-quadrado na linha do Teste Exato de Fisher e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de determinada aberração cromossômica (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991).

Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 0,05.

4.2.6 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana sob protocolo nº 098/2011 (anexo I). A pesquisa foi realizada observando os princípios éticos da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/1996 esclarecendo os sujeitos da pesquisa quanto à justificativa, os objetivos do estudo e todos os procedimentos utilizados. Dentro destes princípios, os indivíduos tiveram plena liberdade de aceitar, ou não, participar do estudo e o sigilo das informações foi garantido a todos que aceitaram participar da pesquisa. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice II) foi assinado pelos participantes e pelo pesquisador. As coletas foram realizadas por técnico capacitado para tal função e em condições de assepsia adequadas no Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da UEFS, destino também do descarte das agulhas e do sangue utilizados na pesquisa.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

5.1.1 Idade

As médias de idade \pm desvio padrão dos Grupos I, II e III foram respectivamente 23,45 \pm 3,204, 23,95 \pm 3,086 e 22,45 \pm 2,911 (Tabela 1). A avaliação da diferença observada entre as médias de idade dos grupos realizada com a ANOVA não revelou significância estatística: F= 1,246, p= 0,292.

5.1.2 Consumo de bebida alcoólica

Nos Grupos I, II e III, respectivamente 13, 13 e 12 participantes consumiam bebidas alcoólicas regularmente. Nenhum dos indivíduos participantes informou ter o hábito de ingerir bebidas alcoólicas com frequência superior a uma vez por semana (Tabela 1).

Tabela 1: Dados referentes ao consumo de bebida alcoólica

| Variáveis | | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Média de idade \pm desvio padrão | | 23,45 \pm 3,204 | 23,95 \pm 3,086 | 22,45 \pm 2,911 |
| Consumidores de bebida alcoólica | n ^o | 13 | 13 | 12 |
| | % | 86,67 | 65 | 60 |

5.1.3 Prática de exercícios físicos

No Grupo I, 12 participantes faziam treinamento de força cinco vezes por semana e três treinavam apenas três vezes por semana. Além da musculação, dez indivíduos deste grupo relataram também a prática de atividades aeróbicas regularmente, enquanto os outros participantes do mesmo grupo informaram praticar apenas musculação. Dentre os indivíduos do Grupo II, dez participantes faziam treinamento de força cinco vezes por semana e dez treinavam três vezes por semana. Neste grupo, a prática regular de atividade aeróbica foi relatada por 17 participantes enquanto três relataram a prática apenas de musculação. No Grupo III todos os indivíduos eram sedentários.

5.1.4 Anabolizantes e padrões de uso

O EAA metildrostanolona (*designer steroid*) foi aquele de maior incidência dentro do grupo de usuários (75,33%). Neste grupo, 11 relataram consumir a droga. O uso do EAA estanozolol (WINSTROL[®]) foi realizado por apenas um indivíduo. Os EAA decanoato de nandrolona (DECA-DURABOLIN[®]) e DURATESTON[®] (combinação dos EAA propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona) também foram consumidos por um indivíduo cada. Apenas um dos participantes disse ter consumido dois EAA simultaneamente, foram eles o decanoato de nandrolona (DECA-DURABOLIN[®]) e o DURATESTON[®]. Ciclos de uso dos EAA foram estabelecidos por oito usuários enquanto sete fizeram uso isolado e não programado. A duração dos ciclos, a duração total de uso, bem como as dosagens utilizadas por todos os usuários de EAA estão resumidas na Tabela 2.

Os usuários (Grupo I), exceto aqueles que fizeram uso isolado e não programado, utilizaram a metildrostanolona em dosagens recomendadas pelo fabricante, uma a duas pílulas por dia com duração máxima do ciclo de quatro semanas. Tendo em vista que cada pílula contém 10 mg do DS, as dosagens totais observadas entre estes usuários foram resultado das diferentes combinações possíveis entre duração do ciclo, três ou quatro semanas, e quantidade de pílulas por dia, uma ou duas.

Tabela 2: Dados referentes ao uso de anabolizantes.

| Usuário | EAA | Duração | | DT (mg) |
|---------|---------------------------------------|---------------------------|------------|---------|
| | | Último ciclo (semanas) | T | |
| 01 | Decanoato de Nandrolona + DURATESTON® | 8 | >2 anos | 700 |
| 02 | Metildrostanolona | 4 | >1 ano | 490 |
| 03 | Metildrostanolona | 4 | >6 meses | 420 |
| 04 | Metildrostanolona | 3 | Não obtido | 420 |
| 05 | Metildrostanolona | 4 | <6 meses | 280 |
| 06 | Metildrostanolona | 4 | Não obtido | 280 |
| 07 | Metildrostanolona | 4 | >1 ano | 280 |
| 08 | DURATESTON® | não se aplica | >1 ano | 250 |
| 09 | Metildrostanolona | 3 | >1 ano | 210 |
| 10 | Decanoato de Nandrolona | não se aplica | <6 meses | 100 |
| 11 | Metildrostanolona | não se aplica | <6 meses | 100 |
| 12 | Metildrostanolona | não se aplica | <6 meses | 100 |
| 13 | Metildrostanolona | não se aplica | <6 meses | 70 |
| 14 | Metildrostanolona | não se aplica | <6 meses | 40 |
| 15 | Estanozolol | não se aplica | <6 meses | 20 |

(T) tempo total do uso de EAA; (DT) soma das doses do último ciclo.

5.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A avaliação das diferenças entre os Grupos I, II e III quanto à ocorrência de MN feita com o Teste Condicional de Proporções em Situações de Eventos Raros mostrou diferenças significantes: $\chi^2= 6,5238$; G.L.= 2; $p<0,05$. As partições de qui-quadrado revelam que nas células obtidas do Grupo I o número de MN foi significativamente maior do que o observado tanto nas células do Grupo II ($\chi^2= 5,2112$; G.L.= 1; $p< 0,05$) quanto nas do grupo III ($\chi^2= 4,2231$; G.L.= 1; $p< 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando feita comparação entre a ocorrência de MN entre o Grupo II e o Grupo III ($\chi^2= 0,0580$; G.L.= 1; $p > 0,5$). Dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos.

| Grupo | N | MN obs. | MN esp. | #cels | χ^2 | Partições do χ^2; p; G.L.=1 |
|--------------|----------|----------------|----------------|--------------|----------------------------|--|
| I | 15 | 46 | 33,46 | 15355 | 6,5238 | (I) x (II) = 5,2112, p < 0,05 |
| II | 20 | 37 | 44,32 | 20341 | G.L.= 2 | (I) x (III) = 4,2231, p < 0,05 |
| III | 20 | 39 | 44,21 | 20288 | p<0,05 | (II) x (III) = 0,0580, p > 0,5 |

MN obs.=número de micronúcleos observados; MN esp.= número de micronúcleos esperados; #cels=total de células

6. DISCUSSÃO

A diversidade de hormônios esteroides existentes no mercado recentemente tem englobado também drogas não conhecidas ou aprovadas por agências de vigilância sanitária, tornando difícil quantificar a real extensão dos danos provocados em usuários. Um novo grupo de EAA chamados *designer steroids* (DS) tem se tornado bastante popular entre jovens, devido à sua fácil obtenção e preços mais reduzidos, contribuindo significativamente para o aumento da prevalência do uso de EAA na população (SHIPLEY, 2005; VAN EENO; DELBEKE, 2006; KAZLAUSKAS, 2010). O uso abusivo de EAA está associado a efeitos adversos dentre os quais o desenvolvimento de câncer é um dos mais preocupantes (JOHNSON *et al.*, 1972; STROMEYER; SMITH, 1979; ROBERTS; ESSENHIGH, 1986; KOSAKA *et al.*, 1996; MARTORANA *et al.*, 1999; HARDT *et al.*, 2012). A adoção de medidas primárias de prevenção do câncer é a estratégia mais efetiva para a diminuição das altas taxas de morbidade e mortalidade por essa doença, observadas em todo o mundo, e entre tais medidas, o uso de biomarcadores de risco vem sendo considerado valiosa ferramenta (BONASSI; NERI; PUNTONI, 2001; BONASSI; WILLIAM, 2002; FENECH, 2002). Um dos métodos mais comumente utilizados no biomonitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos é o MNcTb tendo se revelado eficaz na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer (EL-ZEIN *et al.*, 2006; BONASSI, *et al.*, 2007; IAMARVOVAI *et al.*, 2008; CHANG; LI; LI, 2010). Entretanto, não há relatos na literatura do biomonitoramento de grupos expostos a EAA, com uso desta metodologia. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do MNcTb em linfócitos humanos como biomarcador para o risco de câncer em usuários de EAA.

Os resultados encontrados revelaram uma maior frequência de danos cromossômicos, traduzidos como MN, em usuários de EAA quando comparados a não usuários, o que está em concordância com outros estudos em que se investigou o potencial genotóxico dos EAA (DHILON, *et al.*, 1995; KAYANI; PARRY, 2007; DORN *et al.*, 2008a, 2008b; MEIRELES *et al.*, 2013). Porém, esta associação não é consensual na literatura e outras investigações apontam para a ausência de genotoxicidade destas drogas (RICHOLD, 1988; HOLDEN; STUDWELL; MAJESKA, 1999; AHMAD; SHADAD; AZFER, 2003). A controvérsia observada é amenizada quando consideramos apenas os trabalhos *in vivo* realizados em humanos que apesar de escassos, revelam em sua maioria o aumento de marcadores de dano

genético em usuários de EAA (TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010; SOUZA, 2013).

Talvez, o potencial genotóxico observado seja influenciado pela distribuição e metabolismo destas drogas não podendo ser adequadamente avaliados em ensaios *in vitro*. Por exemplo, EAA como a trembolona e a nandrolona podem ser convertidos pela enzima aromatase, nos tecidos adiposo, cerebral e testicular, para o estrógeno 17-beta-estradiol. Mutações de ponto e danos cromossômicos tanto em cultura de células quanto *in vivo*, têm sido observados na presença do 17-beta-estradiol e seus metabólitos, considerados também indutores da proliferação celular (LIEHR, 2001; JOOSTEN, *et al.*, 2004). A formação deste isômero do estradiol tem sido um dos mecanismos propostos para explicar a genotoxicidade dos EAA (TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2013).

A prática de atividade física tem sido associada em alguns estudos com o aumento de danos genéticos sendo proposto um mecanismo de indução baseado na produção de espécies reativas de oxigênio com conseqüente aumento da atividade oxidativa (HARTMAN *et al.*, 1994; WIERZBA *et al.*, 2006). Com o objetivo de investigar esta variável foi incluído um grupo controle, composto apenas por indivíduos sedentários. Os resultados obtidos não revelaram diferenças significativas das frequências de MN entre os indivíduos do Grupo II, praticantes recreativos de musculação, que em sua maioria também realizavam atividades aeróbicas, e os indivíduos do Grupo III, composto apenas por sedentários. Estes resultados são corroborados por outros estudos (PAVÃO *et al.*, 2007; REICHHOLD *et al.*, 2008).

Entre os indivíduos do Grupo I, o número de usuários do DS metildrostanolona, conhecido também como metasterona, foi muito superior (75,3%) ao número dos usuários de anabolizantes tradicionais aprovados como drogas legais. Esta grande diferença deve-se à atual popularidade dos DS entre praticantes recreativos de musculação, que muitas vezes desconhecem a verdadeira natureza da droga. É também provável que estes usuários tenham menos dificuldade em informar o consumo do que os indivíduos que fazem uso de EAA tradicionais. É possível que a fácil aquisição e administração dos DS, aliadas à desinformação, tem contribuído para o aumento do uso deste grupo de EAA. Tendo em vista a grande incidência de usuários da metildrostanolona neste estudo, a genotoxicidade significativamente superior do Grupo I comparado aos outros grupos, evidentemente teve contribuição relevante deste DS.

A metildrostanolona é 17-alfa-alquilada e por isso apresenta o grupo metil na posição C-17, o que permite sua administração via oral. Interessante notar que na literatura observa-se

uma maior associação entre EAA 17-alfa-alquilados, dano genético e desenvolvimento de câncer, quando comparados a EAA não alquilados. Joosten *et al.* (2004) em revisão de literatura sobre a genotoxicidade dos hormônios esteroides, encontrou trabalhos em que se investigou o potencial genotóxico tanto de 17-alfa-alquilados, fluoximesterona, metiltestosterona, oximetolona e estanozolol, quanto de não alquilados, trembolona e testosterona. Entre todas as investigações revisadas apenas o EAA 17-alfa-alquilado fluoximesterona foi capaz de induzir alterações genéticas, traduzidas como troca entre cromátides irmãs e MN, tanto em linfócitos humanos *in vitro* quanto em medula óssea de roedores *in vivo*.

A análise dos estudos de caso em que se reportou o desenvolvimento de câncer decorrente do abuso de EAA revela que para todos os trabalhos em que foram informados os anabolizantes administrados, o desenvolvimento de câncer esteve associado com a administração de algum EAA 17-alfa-alquilado, seja isolado ou em associação com outros esteroides anabolizantes (STROMEYER; SMITH, 1979; ROBERTS; ESSENHIGH, 1986; KOSAKA *et al.*, 1996; MARTORANA *et al.*, 1999; HARDT *et al.*, 2012). Como exemplo, Kosaka *et al.* (1996) em revisão de literatura sobre o desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares na população japonesa decorrente do uso terapêutico prolongado de EAA encontraram, em todos os 11 casos em que foi possível identificar os EAA administrados, o uso de algum EAA 17-alfa-alquilado sendo que em apenas dois deles o uso foi em conjunto com anabolizantes não alquilados.

Os mecanismos envolvidos nesta indução ao dano genético e ao câncer por EAA 17-alfa-alquilados são pouco compreendidos. Welder, Robertson e Melchert (1995) avaliaram a toxicidade de EAA 17-alfa-alquilados e de hormônios esteroides não alquilados em hepatócitos de ratos. Foi observada hepatotoxicidade direta apenas para os EAA 17-alfa-alquilados estanozolol, metiltestosterona e oximetolona. Associada à hepatotoxicidade houve, também, para os EAA oximetolona e metiltestosterona, a diminuição dos níveis da glutatona, tripeptídeo que desempenha uma série de funções protetivas nas células incluindo aquelas contra o dano oxidativo através da formação de conjugados com os radicais livres. Os radicais livres são instáveis e altamente reativos, pois facilmente perdem átomos de hidrogênio e formam ligações covalentes com constituintes celulares. Estes radicais podem ligar duas moléculas de DNA diferentes impedindo sua separação correta durante a divisão celular ou ligar bases em uma mesma molécula de DNA (TORRES-BUGARÍN *et al.*, 2007). É possível que a diminuição da glutatona, e conseqüente aumento do estresse oxidativo,

esteja associada com a genotoxicidade mais pronunciada dos EAA 17-alfa-alquilados, porém, não há trabalhos investigando diretamente esta relação.

A avaliação do potencial genotóxico de DS tem registro apenas em dois trabalhos. Nestes estudos foram investigados a genotoxicidade dos DS Madol (Dorn *et al.*, 2008a) e Tetrahidrogentrinona (Dorn *et al.*, 2008b) com o uso do Teste de Micronúcleo em linhagens de células V79. Os resultados mostraram um aumento dose-dependente da frequência de MN em ambos os trabalhos, sendo observado uma resposta genotóxica significativa mesmo em pequenas concentrações destes DS.

Estudos toxicológicos específicos para a mestildrostanolona são escassos na literatura devido aos poucos anos de existência da sua comercialização, sendo inicialmente identificados em 2005 (SHIPLEY, 2005; VAN EENO; DELBEKE, 2006; KAZLAUSKAS, 2010). Os trabalhos sobre a metildrostanolona mais frequentemente encontrados fazem referência a casos em que houve o desenvolvimento de lesões hepáticas, principalmente as lesões hepáticas colestáticas (JASIURKOWSKY *et al.*, 2006; KAFROUNI; ANDERS; VERMA, 2007; SHAH, 2008). Estas lesões ocorrem não apenas em usuários deste DS, mas em usuários de EAA 17-alfa-alquilados de uma maneira geral (KULLAK-UBLICK, 2000; ELSHARKAWY *et al.*, 2012) e são consideradas incomuns. Nos estudos acima citados estas lesões se desenvolveram em um curto período de uso da metildrostanolona, que variou de 4 a 6 semanas, o que aponta para a hepatotoxicidade elevada deste EAA haja vista o curto período de exposição e a gravidade desta lesão, que pode levar a morte (KAFROUNI; ANDERS; VERMA, 2007).

Apesar das informações limitadas na literatura a respeito dos DS existe a possibilidade de que muito do que se tem conhecido a respeito da genotoxicidade dos EAA tradicionais, aprovados como drogas legais, possam ser estendidos para os DS. As similaridades entre suas estruturas químicas e os efeitos adversos semelhantes sugerem que, em muitos casos, talvez, as diferenças entre estes dois grupos de EAA sejam apenas mais uma questão de origem do que de natureza. O uso abusivo de DS pode ainda ser considerado motivo de maior preocupação visto que alguns deles têm sido identificados como EAA já patenteados, mas que não tinham sido industrializados devido a sua toxicidade (CATLIN; AHRENS; KUCHEROVA, 2002; SEKERA *et al.*, 2005), ou que nunca passaram por qualquer avaliação toxicológica por agências fiscalizadoras (LOOTENS *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2013). Como agravante, no presente estudo foi observado em academias de musculação uma maior frequência do uso dos DS em comparação aos outros EAA, o que refletiu na amostra final de usuários. Tal constatação traz preocupações sobre a real prevalência do uso destas

drogas, que somadas aos EAA tradicionais pode superar em muito as taxas de prevalências normalmente reportadas por estudos epidemiológicos sobre EAA.

Os resultados obtidos apontam para o potencial dos EAA em induzir danos genéticos, particularmente do *designer steroid* metildrostanolona, o mais utilizado entre os indivíduos do Grupo I e que tem estrutura similar ao EAA drostanolona. A sua estrutura 17-alfa-alquilada, os resultados de estudos sobre sua toxicidade incluindo os estudos de caso citados e a genotoxicidade observada neste estudo, somados à sua grande popularidade, os tornam importante substrato para novas investigações.

O MNcTB se mostrou sensível na detecção de danos cromossômicos em usuários de EAA, porém, a despeito dos resultados aqui descritos, o seu uso no biomonitoramento de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer, em usuários de EAA, necessita de estudos com números amostrais mais significativos, e com diferentes EAA para mensurar a real extensão de sua aplicação.

7. CONCLUSÕES

O uso de EAA induz danos cromossômicos, traduzidos como MN, em humanos nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos;

O MNcTb se mostrou sensível na identificação de danos cromossômicos decorrentes do uso de EAA, porém, necessário se faz a realização de estudos subsequentes com números amostrais mais significativos para determinar seu valor preditivo para o risco de câncer.

A atividade física realizada pelos não usuários de EAA, praticantes de musculação participantes do presente estudo, não induz danos cromossômicos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. E.; SHADAB, G. G.; AZFER, M. A. Effect of oxymetholone on SCE frequency in human lymphocyte chromosomes in vitro. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 23, p. 267–272, 2003.

AMSTERDAM, J. V.; OPPERHUIZEN, A.; HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic–androgenic steroids. **Regul Toxicol and Pharm**, v. 57, p. 117-123, 2010.

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, p. 614-620, 2004.

BECKMAN, R. A.; LOEB, L. A. Genetic instability in cancer: theory and experiment. **Semin Cancer Biol**, v. 15, p. 423-435, 2005.

BELL, A.; MAYCOCK, B.; MCLEAN, N. Current perspectives on anabolic steroids. **Drug Alcohol Rev**, v. 17, p. 87-103, 1988.

BHASIN, S. *et al.* The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **New Engl J Med**, v. 335, p. 1-7, 1996.

BHASIN, S. *et al.* Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. **J Clin Endocr Metab**, v. 82, p. 407-413, 1997.

BHASIN, S. *et al.* Testosterone dose-response relationships in healthy young men. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 281, p. 1172-1181, 2001.

BOADA, L. D. *et al.* Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. **Arch Toxicol**, v. 73, p. 465-472, 1999.

BONASSI, S. *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. **Cancer Res**, v. 60, p. 1619-1625, 2000.

BONASSI, S.; NERI, M.; PUNTONI, R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. **Mutat Res**, v. 480-481, p. 349-358, 2001.

BONASSI, S.; WILLIAM, W, A. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat Res**, v. 511, p. 73-86, 2002.

BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 625-631, 2007.

BONASSI, S. *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 93-100, 2011.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. A. R.; MONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese : Métodos e critérios de avaliação**. São Paulo: Sociedade Brasileira de genética, p.113-21, 1991.

BRONSON, F. H.; MATHERNE, C. M. Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, p. 615-619, 1997.

BROWN, J. A.; VUKOVICH, M.; KING, D. S. Testosterone Prohormone Supplements. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, p. 1451-1461, 2006.

CARLINI, E. A. *et al.* **VI Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras**. 1. Ed. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, UNIFESP, 2010. 503 p.

CASAVANT, M. J. *et al.* Consequences of use of anabolic androgenic steroids. **Pediatr Clin N Am**, v. 54, p. 677-690, 2007.

CATLIN, D.H.; AHRENS, B. D.; KUCHEROVA, Y. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 16, p. 1273-1275, 2002.

CAVALCANTI, G. A. Detection of designer steroid methylstenbolone in “nutritional supplement using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites. **Steroids**, v. 78, p. 228-233, 2013.

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

CERQUEIRA, E. M. M. *et al.* Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol.**, v. 42, p. 639-649, 1998.

CHANG, P.; LI, Y.; LI, D. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. **Carcinogenesis.**, v. 32, p. 210-215, 2010.

CIMINO, M. C. Comparative Overview of Current International Strategies and Guidelines for Genetic Toxicology Testing for Regulatory Purposes. **Environ Mol Mutagen**, v. 47, p. 362-390, 2006.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neurosci and Biobehav R**, v. 27, p. 413-436, 2003.

CREAGH, T. M.; RUBIN, A.; EVANS, D. J. Hepatic tumours induced by anabolic steroids in an athlete. **J Clin Pathol**, v. 27, p. 441-443, 1988.

DHILLON, V. S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of hormonal drugs. VI. Fluoxymesterone. **Mutat Res**, v. 342, p. 103–111, 1995.

DORN, S. B. *et al.* Micronucleus induction in V79 cells by the anabolic doping steroids desoxymethyltestosterone (madol) and 19-norandrostenedione. **Toxicol Lett**, v. 183, p. 58-64, 2008a.

DORN, S. B. *et al.* Induction of micronuclei in V79 cells by the anabolic doping steroids tetrahydrogestrinone and trenbolone. **Arch Toxicol**, v. 82, p. 257-263, 2008b.

DUCHAINE, D. **The Original Underground Steroid Handbook**. OEM Publishing, Santa Monica, CA. 1981.

DUNN, D.; WHITE, V. The epidemiology of anabolic–androgenic steroid use among Australian secondary school students. **J Sci Med Sport**, v. 14, p. 10-14, 2011.

DZAMUKOV, R. A.; VALIULLIN, V.V. The response of skeletal muscles to anabolic steroid is individual and does not depend on the motor activity mode. **B Exp Biol Med**, v. 123, p. 406-408, 1999.

ELSHARKAWY, A. M. *et al.* Cholestasis secondary to anabolic steroid use in young men. **BMJ**, v. 344, p. 468, 2012.

EKLOF, A. *et al.* The anti-doping hot-line, a means to capture the abuse of doping agents in the Swedish society and a new service function in clinical. **Eur J Clin Pharmacol pharmacology**, v. 59, p. 571-577, 2003.

EL-ZEIN, R. A. *et al.* Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. **Cancer Res**, v. 66, p. 6649-6456, 2006.

ERIKSSON, A. *et al.* Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. **Histochem Cell Biol**, v. 124, p. 167-175, 2005.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **Am J Sport Med**, v. 32, p. 534-542, 2004.

FANTON, L. *et al.* Heart lesions associated with anabolic steroid abuse: comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits **Exp and Toxicol Pathol**, v. 61, p. 317-323, 2009.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solution to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 233-246, 1985.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002.

FENECH, M. *et al.* HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat Res**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

FILHO, J. C. S. C. *et al.* Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, p. 243-247, 2006.

FITZPATRICK, F. **Where steroids were all the rage: A doctor's curiosity and a businessman's love of weightlifting set off a revolution in York.** 2002. Disponível em: <http://articles.philly.com/2002-10-20/sports/25352734_1_steroids-york-barbell-chuck-yesalis> Acesso em: 15 de maio 2011.

GALDURÓZ, J. C. F. *et al.* **V Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras 2004.** 1. Ed. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, UNIFESP, 2004. 399 p.

GAUTHIER, J. *et al.* Identification of drostanolone and 17-methylandrostanolone metabolites produced by cryopreserved human hepatocytes. **Steroids**, v. 74, p. 306-314, 2009.

GEORGE, A. The actions and side effects of anabolic steroids in sport and social abuse. **Andrologie**, v. 13, p. 354-366, 2003.

GLEESON, D. *et al.* Androgen associated hepatocellular carcinoma with an aggressive course. **Gut**, v. 32, p. 1084-1086, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARDT, A. *et al.* Development of hepatocellular carcinoma associated with anabolic androgenic steroid abuse in a young bodybuilder: A Case Report. **Case Rep Pathol**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

HARTMAN, A. *et al.* Does physical activity induce DNA damage? **Mutagenesis**, v. 9, p. 269-272, 1994.

HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N. A. Medical issues associated with anabolic steroid. **J Sport Sci Med**, v. 5, p. 182-193, 2006.

HOLDEN, H. E.; STUDWELL, D.; MAJESKA, JENNESS B. Oxymetholone: I. evaluation in a comprehensive battery of genetic toxicology and in vitro transformation assays. **Toxicol Pathol**, v. 27, p. 501-506, 1999.

IAMARCOVAI, G. *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. **Mutat Res**, v. 659, p. 274-283, 2008.

IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cad Saúde Pública**, v. 25, p. 773-782, 2009.

ISMAIL, T. K. *et al.* Cardiac effects of anabolic steroid use amongst recreational body builders - a CMR study. **J Cardio Magn Reson**, v. 14, p. 186, 2012.

JASIURKOWSKY, B. *et al.* Cholestatic Jaundice and IgA Nephropathy Induced by OTC Muscle Building Agent Superdrol. **Am J Gastroenterol**, v. 101, p. 1-4, 2006.

JOHNSON, F. L. *et al.* Association of androgenic-anabolic steroid therapy with development of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 300, p. 1273-1276, 1972.

JOHNSTON, L.D. *et al.* Monitoring the future national results on adolescent drug use: Overview keyfindings 2010. **National Institute on Drug Abuse Publication**, 2011.

JOOSTEN, H. F. P. Genotoxicity of hormonal steroids. **Toxicol Lett.**, v. 151, p. 113-134, 2004.

KAFROUNI, M. I.; ANDERS, R. A.; VERMA, S. Hepatotoxicity associated with dietary supplements containing anabolic steroids. **Clin Gastroenterol H**, v. 5, p. 809-812, 2007.

KANAYAMA, G. Illicit anabolic androgenic steroid use. **Horm Behav.**, v. 58, p. 111-121, 2010.

KAYANE, M. A.; PARRY, J. M. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. **Mutat Res**, v. 651, p. 40-45, 2007.

KAZLAUSKAS, R. Designer steroids. **Handb Exp Pharmacol**, v. 195, p. 155-185, 2010.

KICKMAN, A. T.; GOWER, D. B. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. **Ann Clin Biochem**, v. 40, p. 321-356, 2003.

KICKMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol**, v. 25, p. 502-521, 2008.

KOKKEVI, A. *et al.* Daily exercise and anabolic steroids use in adolescents: a cross-national european study. **Subst Use Misuse**, v. 43, p. 2053-2065, 2008.

KOSAKA, A. T. *et al.* Hepatocellular carcinoma associated with anabolic steroid therapy: Report of a case and review of the Japanese literature. **J Gastroenterol**, v. 31, p. 450-454, 1996.

KUHN, C. Anabolic steroids. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 411-434, 2002.

KULLAK-UBLICK, G. A. Drug-Induced Cholestatic Liver Disease. In: **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6102/>> Acesso em: 15 de novembro de 2012.

LIEHR, J. G. Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? **Endocr Ver**, v. 21, p. 40-54, 2000.

LOEB, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 51, p. 3075-3079, 1991.

LONCAR, D. *et al.* Effect of a low-dose ethinylestradiol and gestodene in combination on the frequency of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes of healthy women in vivo. **Contraception**, v. 69, p. 327-331, 2004.

LOOTENS, L. *et al.* Metabolic studies with promagnon, methylclostebol and methasterone in the uPA+/-SCID chimeric mice. **J Steroid Biochem**, v. 127, p. 374-381, 2011.

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

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. **Mutat Res**, 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.

MARTORANA, G. *et al.* Anabolic steroid abuse and renal cell carcinoma. **J Urology**, v. 162, p. 2089, 1999.

MEIRELES, J. R. C. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (depo-steron®). **Mutat Res**, v. 753, p. 72-75, 2013.

MELLONI, R.; RICCI L. Adolescent exposure to anabolic/androgenic steroids and the neurobiology of offensive aggression: a hypothalamic neural model based on findings in pubertal Syrian hamsters. **Horm Behav**, v. 58, p. 177-191, 2010.

MOTTRAM, D. L.; GEORGE, A. J. Anabolic steroids. **Bailliere Clin Endoc**, v. 14, p. 55-69, 2000.

PAVÃO, P. R. G. *et al.* Ausência de efeito genotóxico induzido por esteroides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp.** v.21, p. 5-10, 2007.

PHILLIPS, W. **Anabolic Reference Guide**. Golden, CO. 1985.

POPE, G. H.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I. Risk Factors for Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use in Male Weightlifters: A Cross-Sectional Cohort Study. **Biol Psychiatry**, v. 71, p. 254-261, 2012.

PRAT, J. *et al.* Wilms tumor in an adult associated with androgen abuse. **Jama-J Am Med Assoc**, v. 237, p. 2322-2323, 1977.

REICHHOLD, S. *et al.* No Acute and Persistent DNA Damage after an Ironman Triathlon. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, p. 1913-1919, 2008.

RICHOLD, M. The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. **Arch. Toxicol**, v. 61, p. 249-258, 1988.

ROBERTS, J.T.; ESSENHIGH, D. M. Adenocarcinoma of prostate in 40-year-old bodybuilder. **Lancet**, v. 2, p. 742, 1986.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. ULBRA, Rio Grande do Sul, p. 201-222, 2003.

SATOH, K.; GOTOH, T.; YAMASHITA, H. Morphological effects of an anabolic steroid on muscle fibres of the diaphragm in mice. **J Electron Microsc**, v. 49, p. 531-538, 2000.

SADER, M. A. *et al.* Androgenic Anabolic Steroids and Arterial Structure and Function in Male Bodybuilders. **J Am Coll Cardiol**, v. 37, p. 224-230, 2001.

SCARTH, J. P. *et al.* Comparative in vitro metabolism of the 'designer' steroid estra-4,9-diene-3,17-dione between the equine, canine and human: Identification of target metabolites for use in sports doping control. **Steroids**, v. 75, p. 643-652, 2010.

SEKERA, M. H. *et al.* Another designer steroid: discovery, synthesis, and detection of 'madol' in urine. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 19, p. 781-784, 2005.

SHA, N. L. *et al.* Methasteron-associated cholestatic liver injury: clinicopathologic findings in 5 cases. **Clin Gastroenterol H**, v. 6, p. 255-258, 2008.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clin Ther**, v. 23, p. 1355-1390, 2001.

SHIPLEY A. Steroids detected in dietary tablets. **The Washington Post**, Novembro 2005. Disponível em: <<http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2005/11/29/AR2005112901636.html>> Acesso em: 12 de agosto de 2012.

SINHA-HIKIM, I. *et al.* Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, p. 154-164, 2002.

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

SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Rev Bras Cienc Farm** v. 39. p. 327-332, 2003.

SNYDER, P. J. *et al* Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. **J Clin Endocr Metab**, v. 85, p. 2670-2677, 2000.

SOUZA, L. C. M.; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Assessment of nuclear abnormalities in exfoliated cells from the oral epithelium of mobile phone users. **Electromagn Biol Med**, p. 1-5, 2013.

SOUZA, J. P. **Avaliação da ocorrência de danos cromossômicos, apoptose e necrose em células esfoliadas da mucosa oral de usuários de esteroides anabolizantes androgênicos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, p. 719-724, 2009.

STROMEYER, F. W.; SMITH, D. H.; ISHAK, K. G. Anabolic steroid therapy and intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer**, v. 43, p. 440-443, 1979.

SULIVAN, M. L. *et al.* The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 1, p. 1-15, 1998.

TAN, R. S.; SCALLY, M. C. Anabolic steroid-induced hypogonadism – Towards a unified hypothesis of anabolic steroid action. **Med Hypotheses**, v. 72, p. 723-728, 2009.

TORRES-BUGARÍN, O. *et al.* Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. **Br J Sports Med.**, v. 41, p. 592-596, 2007.

VAN EENO, P.; DELBEKE, F. T. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control — New steroids and new insights. **J Steroid Biochem**, v. 101, p. 161-178, 2006.

WADA. **The 2006 prohibited list: international standard. 2006.** Disponível em: <http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2006_EN.pdf> Acesso em: 15 de agosto 2012.

WANG, C. *et al.* Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. **J Clin Endocr Metab**, v. 85, p. 2839-2853, 2000.


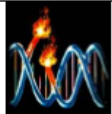
WELDER, A. A.; ROBERTSON, J. W.; MELCHERT, R. B. Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. **J Pharmacol Toxicol**, v. 83. p. 187-195, 1995.

WIERZBA, T. H. *et al.* Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. **J Physiol Pharmacol**, v. 57. p. 115-131, 2006.

WU, F. C. W. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clin Chem**, v. 43. p. 1289-1292, 1997.

YUAN, X.; FORMAM, B. M. Detection of designer steroids. **Nucl Recept Signal**, v. 3. p. 1-5, 2005.

APÊNDICE I

| | | |
|---|--|---|
|  | UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Laboratório de Genética Toxicológica |  |
|---|--|---|

FORMULÁRIO DE ENTREVISTA

| DADOS GERAIS | | | |
|----------------------------------|-----------------------|---|---------------------------|
| 01. Questionário n°: _____ | | 2. Data: ___/___/___ | |
| 03. Local: _____ | | 04. Município: _____ | |
| IDENTIFICAÇÃO | | | |
| 05. Número: _____ | | 06. Data de nascimento: ___/___/___ | |
| 07. Naturalidade: _____ | | 08. Idade: () anos | |
| 09. Sexo: () | 1. Masculino | 10. Cidade: _____ | |
| | 2. Feminino | | |
| 11. Telefone: () _____ - _____ | | 12. Ocupação Atual: _____ | |
| 13. Tempo de Atividade: _____ | | 14. Ocupação Anterior: _____ | |
| ANTECEDENTES FAMILIARES | | | |
| 15. Câncer na Família: () | 1. Sim | 16. Localização Topográfica: () | |
| | 2. Não | 1. Boca | 2. Colo Uterino |
| | | 3. Mama | 4. Próstata |
| | | 5. Pele | 6. Outros |
| | | 7. Não se aplica | |
| HÁBITOS DE FUMAR | | | |
| 17. Hábitos Tabagistas: () | 1. Sim | 18. Quanto Tempo: () anos | |
| | 2. Não | () meses | |
| | | () Não se aplica | |
| 19. Tipo do Cigarro: () | | 20. Quantidade de cigarros por dia: () | |
| 1. Cigarro | 2. Cigarro Industrial | 1. De 1 a 5 | 2. De 6 a 10 |
| 3. Cachimbo | 4. Charutos | 3. De 11 a 15 | 4. De 16 a 20 |
| 5. Outros | 6. Não se aplica | 5. Mais de 20 | 6. Não se aplica |
| 21. Traga Cigarro: () | 1. Sim | 22. Marca do Cigarro: _____ | |
| | 2. Não | () Não se aplica | |
| 23. Já Fumou: () | 1. Sim | 24. Há quanto tempo parou: () anos | |
| | 2. Não | () meses | |
| | | () Não se aplica | |
| 25. Quantos cigarros fumava: () | 1. De 1 a 5 | 26. Por quanto tempo fumou: () anos | |
| | 2. De 6 a 10 | () meses | |
| | 3. De 11 a 15 | () Não se aplica | |
| | 4. De 16 a 20 | | |
| | 5. De 21 a 30 | | |
| | 6. Mais de 30 | | |
| HÁBITOS DE BEBER | | | |
| 27. Uso de bebida alcoólica: () | 1. Sim | 28. Frequência: () | 1. Diariamente |
| | 2. Não | | 2. 2 a 3 vezes por semana |
| | | | 3. 1 vez por semana |
| | | | 4. 1 vez por mês |
| | | | 5. Raramente |
| | | | 6. Não obtido |
| | | | 7. Não se aplica |

| | | | |
|----------------------------|---|-----------------------------|--|
| 29. Tipo de bebida: () | | 30. Quanto bebe: | () copos () Não se aplica |
| 1. Cachaça | 2. Cerveja | | |
| 3. Vinho | 4. Destilada | | |
| 5. Conhaque | 6. Uísque | | |
| 7. Fermentada | 8. Outros | | |
| 9. Não se aplica | | | |
| 31. Há quanto tempo bebe: | () anos () meses () Não se aplica | 32. Já bebeu: () | 1. Sim 2. Não |
| 33. Há quanto tempo parou: | () anos () meses () Não se aplica | 34. Por quanto tempo bebeu: | () anos () meses () Não se aplica |
| 35. Quanto bebia: | () copos () Não se aplica | 36. Bebidas que usava: () | |
| | | 1. Cachaça | 2. Cerveja |
| | | 3. Vinho | 4. Destilada |
| | | 5. Conhaque | 6. Uísque |
| | | 7. Fermentada | 8. Outros |
| | | 9. Não se aplica | |
| 37. Frequência: () | 1. Diariamente 2. 2 a 3 vezes por semana 3. 1 vez por semana 4. 1 vez por mês 5. Raramente 6. Não obtido 7. Não se aplica | | |

| | | | |
|---------------------------------------|-------------------|---|-------|
| USO DE MEDICAMENTOS | | | |
| 38. Uso frequente de medicamento: () | 1. Sim 2. Não | 39. Frequência de uso do(s) medicamento(s): | _____ |
| | | () Não se aplica | |
| 40. Tempo de uso: | _____ | 41. Quais: _____ | |
| | () Não se aplica | | |

| | | | |
|---|---|---------------------------------|---|
| USO DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS (EAA) | | | |
| 42. Uso de EAA: () | 1. Sim 2. Não | 43. Frequência de uso: () | 1. 2 vezes por semana 2. 1 vez por semana 3. 1 vez por mês 4. Raramente 5. Não obtido 6. Não se aplica |
| 44. Há quanto tempo faz uso: | () anos () Não obtido () meses () Não se aplica | 45. Forma de administração: () | 1. Oral 2. Intramuscular |
| 46. Duração do ciclo: () | () meses () semanas () dias () Não obtido () Não se aplica | 47. Intervalos entre os ciclos: | () meses () Não se aplica |

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Leonardo da Cunha Menezes Souza (discente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana) e a Prof^a. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira (orientadora) estamos realizando pesquisa com o objetivo de investigar possíveis alterações no material genético (DNA) em células do sangue (linfócitos) que podem ser decorrentes do uso de anabolizantes hormonais. É importante que se faça estudos desta natureza porque o câncer é uma doença que resulta de alterações em determinados genes. Uma vez que seja revelado que o uso de anabolizantes pode alterar o material genético, sua relação com o câncer pode ser estabelecida e a prática de seu uso desaconselhada. Para a realização dessa pesquisa pedimos que responda a um questionário, o qual você tem liberdade para não fornecer informações que não desejar. Depois de responder ao questionário, agendaremos dia e horário mais conveniente a sua disponibilidade, para que compareça no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde será realizada a coleta de cinco ml de sangue por profissional capacitado, em condições e local apropriados para realização deste procedimento. Isto é rápido, mas como risco você poderá sentir um incômodo no momento da retirada do sangue. Você terá, a qualquer tempo, todo o direito de saber dos resultados. Os indivíduos que apresentem uma maior quantidade de alterações nas células do sangue (linfócitos) serão orientados em relação a fatores outros, que podem estar contribuindo para estas alterações, como por exemplo, hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas. Com isto estaremos contribuindo para maior entendimento sobre os riscos ao qual estamos submetidos quando expostos a esteróides anabolizantes androgênicos.

Será garantido o sigilo das informações obtidas e a divulgação dos resultados, em revista especializada, será feita sem identificação dos participantes. O material coletado e os questionários serão destruídos após cinco anos, sendo que durante este tempo estarão identificados apenas por código e sob guarda do pesquisador responsável no laboratório de Genética Toxicológica da UEFS.

Você tem plena liberdade de aceitar ou recusar a participação nessa pesquisa. Se não quiser participar, ou até mesmo desistir do estudo, em qualquer momento da pesquisa, terá toda liberdade e, não haverá nenhum prejuízo.

Estaremos à disposição para esclarecer qualquer dúvida em relação à pesquisa, pessoalmente, no Laboratório de Genética Toxicológica da UEFS (Av. Transnordestina, s/nº, Campus Universitário de UEFS, Módulo I, Sala: MT 15 – Feira de Santana/BA) ou pelo telefone (75) 3224-8285.

Estando de acordo, pedimos que assine duas vias deste documento que também serão assinados por nós, ficando uma via com o senhor (a) e a outra, com o pesquisador responsável.

Feira de Santana ____ de _____ de _____

Leonardo da Cunha Menezes Souza
Mestrando

Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
Orientadora

Participante

ANEXO I

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS sob protocolo nº 098/2011.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/ CEP-UEFS

Av. Universitária, S/N – Módulo I – 44.031-460 – Feira de Santana-BA
Fone: (75) 224-8124 Fax: (75) 224-8019 E-mail: cep.uefs@yahoo.com.br

Feira de Santana, 20 de outubro de 2011
Of. CEP-UEFS nº 251/2011

Senhor(a) Pesquisador(a): Leonardo da Cunha Menezes Souza

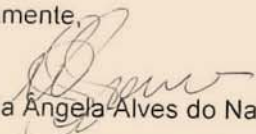
Tenho satisfação em informar-lhe que o seu Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do Teste de Micronúcleo em linfócitos para uso como biomarcador de risco de câncer em usuários de Esteróides Anabolizantes Androgênicos", registrado neste CEP sob protocolo nº 098/2011 (CAAE nº 0103.0.059.000-11), foi apreciado pelos membros do CEP-UEFS e satisfaz às exigências da Res. 196/96. Assim, seu projeto foi **Aprovado**, podendo ser iniciada a coleta de dados com os Sujeitos da pesquisa conforme orienta o Cap. IX.2, alínea a – Res. 196/96.

Na oportunidade informo que qualquer modificação feita no projeto, após aprovação pelo CEP, deverá ser imediatamente comunicada ao Comitê, conforme orienta a Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea b.

Relembro que conforme instrui a Res. 196/96, Cap. IX.2, alínea c, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída.

Em nome dos membros do CEP-UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano (20/10/2012) este CEP aguardará o recebimento do seu relatório.

Atenciosamente,


Profª Maria Ângela Alves do Nascimento
Coordenadora do CEP/UEFS