

**JAQUELINE APARECIDA GEROMEL MARINO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DECANOATO DE NANDROLONA  
E EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA  
HEPÁTICA METABOLIZADORA DE DROGAS EM RATOS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências  
de Botucatu da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Farmacologia)*

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Antônio Francisco Godinho

**2007**

Marino, Jaqueline Aparecida Geromel.

Avaliação dos efeitos do decanoato de nandrolona e exercício físico sobre a atividade enzimática hepática metabolizadora de drogas em ratos / Jaqueline Aparecida Geromel Marino. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Oduvaldo Câmara Marques Pereira

Co-orientador: Antonio Francisco Godinho

Assunto CAPES: 21005001

1. Farmacologia 2. Exercícios físicos - Aspectos farmacológicos

CDD 615.1

Palavras-chave: Decanoato de nandrolona; Exercício físico; Metabolização hepática; Ratos

# *Dedicatória*



**Deus,**

*Deus que é meu pai, me ama e com esse amor me ensinou que o primeiro passo para a sabedoria é o silêncio; o segundo, a escuta e por ter me dado força e direção em todos os momentos da minha vida.*

*“Por que maior é aquele que está em vós do que aquele que está no mundo.”*

*(IJo 4:4<sup>o</sup>)*

**Meus pais,**

*Aos meus pais, João Savério Marino e Joana de Fátima Geromel Marino, pelo exemplo de vida, pelo apoio em todos os momentos, pela participação no nascimento deste sonho e na luta para que se concretizasse.*

*“Você deixou seus sonhos para que eu sonhasse.*

*Derramou lágrimas para que eu fosse feliz.*

*Você perdeu noites de sono para que eu dormisse tranquilo.*

*Acreditou em mim apesar dos meus erros.*

*Ser educador é ser um poeta do amor.*

*Jamais esqueça que eu levarei para sempre um pedaço do*

*seu ser dentro do meu ser...” (Augusto Cury)*

**Minha filha,**

*A minha amada filha Maria Clara pelo presente e preciosidade de sua existência, pela luz e pelo fortalecimento diante dos momentos difíceis.*

*“O amor é um sentimento tão profundo, que as palavras mais belas nem sempre o conseguem expressar, é quando fala a voz do coração!”*

*(Ruis Pais)*

**Meus irmãos,**

*Aos meus irmãos João Leonardo e Adelino pelo incentivo, carinho, amizade e cumplicidade.*

*Só as pessoas que acreditam nelas próprias podem acreditar nas outras. Obrigada por acreditarem em mim!*

# *Agradecimento Especial*



*Ao Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho*

Pela orientação, contribuição e participação em minha iniciação científica e mestrado e pelos preciosos ensinamentos, incentivo constante, apoio, confiança e amizade e, sobretudo pela compreensão em todos os momentos.

*“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...  
Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a  
outra.*

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não  
vai só...*

*Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de  
si mesmos.*

*Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.  
Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam  
nada.*

*Esta é a mais bela realidade da vida...  
A prova tremenda de que cada um é importante e que  
ninguém se aproxima do outro  
por acaso...” (Saint Exupéry)*

*Ao Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira*

Por ter aceitado minha orientação, pela confiança, apoio, ensinamentos e amizade durante o período do mestrado.



# *Agradecimientos*



As minhas amigas que considero como irmãs Carolina (Metrite), Glilciane (Lolita), Jesana (X-Tapa) pelo apoio e atenção em todos os momentos e por não deixarem que eu desanimasse durante este caminho.

A equipe do CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica Alaor, Aninha, Amauri, Denise, Pardal e Rita pelo suporte técnico, amizade e apoio.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos companheiros da pós-graduação e laboratório Cynthia, Lívia, Renata, Fábio pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários da Seção Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos companheiros do Complexo de Unidades de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Aos professores do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Medicina de Botucatu especialmente as docentes. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvana Andréa Molina e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Célia Popim que muito me apoiaram a seguir este caminho.

As minhas amigas da faculdade Aline (Kid's), Andréa (Pakata), Cassiana (Fulera), Juliana (Furdunço) e Thaís (Xita).

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Antonio Carlos Cicogna, à mestranda Olga de Castro Mendes, ao aluno de iniciação científica Dijon Henrique Salomé de Campos, ao José Carlos Georgete e ao Mário Batista Bruno do Centro de Pesquisas Experimentais da Faculdade de Medicina, UNESP de Botucatu, por terem sido tão prestativos durante as partes experimentais que foram realizadas em seus laboratórios.

# *Epígrafe*



*"O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas  
um lugar que estamos criando.*

*O caminho para ele não é encontrado, mas  
construído e o ato de fazê-lo muda tanto o  
realizador quando o destino."*

*(Saint Exupéry)*

# *Sumário*



<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>OBJETIVO</b> .....	14
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
1. Animais e ambiente de experimentação.....	17
2. Drogas e reagentes.....	17
3. Grupos experimentais.....	19
4. Tratamento.....	19
5. Programa de exercício físico de corrida.....	20
6. Parâmetros gerais avaliados.....	23
7. Avaliação do efeito do tratamento sobre o fígado.....	23
8. Análise estatística.....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
1. Ganho de peso corporal.....	37
2. Peso úmido relativo dos órgãos.....	38
3. Função bioquímica do fígado.....	40
4. Dosagem de proteína na fração microsomal hepática.....	41
5. Atividade enzimática do sistema microsomal hepático.....	42
5.1 Cafeína N-demetilase.....	42
5.2 Aminopirina N-demetilase.....	43

5.3 Anilina hidroxilase.....	44
5.4 Antipirina hidroxilase.....	45
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>65</b>



# *Resumo*



O hormônio testosterona sintético é utilizado por atletas e jovens em busca de aquisição de ganho de força física e benefícios estéticos, apesar dos efeitos reversíveis ou irreversíveis que incluem ações hepáticas, endócrinas, cardiovasculares, esqueléticas e subjetivas alterações de comportamento. Este trabalho estudou aspectos da toxicidade enzimática hepática do anabolizante decanoato de nandrolona, em ratos submetidos ao exercício físico de corrida. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, divididos em 4 grupos experimentais (N=7), respectivamente: não treinado e não tratado (NTNT), não treinado e tratado (NTT), treinado não tratado (TNT), treinados e tratados (TT). O decanoato foi administrado na dose de 5mg/kg, i.m., por 6 semanas, duas vezes por semana. Os animais sob treinamento foram submetidos a um total de 3 a 4 sessões de corrida/semana, 20-40 minutos/animal, nas 6 semanas de tratamento. Ao final das 6 semanas, os animais foram anestesiados, sacrificados e os seguintes parâmetros verificados: atividade enzimática, *in vitro*, do sistema microsomal hepático, citocromo P450-dependente, ligado à metabolização de xenobióticos, através da avaliação da atividade das enzimas aminopirina N-demetilase, cafeína N-demetilase, antipirina hidroxilase e anilina hidroxilase; níveis sanguíneos de enzimas indicadoras da função bioquímica do fígado: alanina transferase (ALT), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamil transferase (GGT); ganho de peso corporal dos animais no período de tratamento; peso úmido dos órgãos. A administração de decanoato de nandrolona ou realização de exercício físico de corrida não provocaram alterações na concentração de enzimas indicadoras da função hepática, assim como na dosagem de proteína microsomal; modificaram peso úmido do ducto deferente, vesícula seminal e dos rins; diminuíram a atividade das enzimas cafeína N-demetilase, aminopirina N-demetilase, anilina hidroxilase e antipirina hidroxilase; exercício físico sozinho ou junto com decanoato diminuiu o peso dos animais. Em conclusão, os resultados obtidos nos experimentos demonstram que

administração de Decanoato de Nandrolona em ratos, durante seis semanas, promove inibição da atividade enzimática de N-demetilação e hidroxilação, no fígado dos animais; estas alterações não parecem ser devido a alterações da integridade da célula hepática, mas poderiam ocorrer por ação inibidora, devido à ligação as enzimas de metabolização, ou indiretamente pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e aumento da peroxidação lipídica.

# *Abstract*



Athletes and young use the synthetic hormone testosterone in search of physical force and aesthetic benefits acquisition, although the reversible or irreversible effects that include hepatic, endocrine, cardiovascular, skeletal actions, and subjective alterations of behavior. This work studied aspects of the hepatic enzymatic toxicity of the anabolic nandrolona decanoate, in rats submitted to the physical running exercise. Were utilized male, adult Wistar rats, divided in four experimental groups (N=7), respectively: non-trained not treated (NTNT), non-trained treated (NTT), trained not treated (TNT), trained and treated (TT). The decanoato was administered in the dose of 5mg/kg, i.m., six weeks, two times week. The animals under training had been submitted to a total of three to four running/week sessions, 20-40 minutes/animal, during the six weeks of treatment. At the end of this six weeks period animals had been sacrificed under anesthesia and the following parameters verified: in vitro enzymatic activity of the hepatic microsomal system, citocromo P450-dependent, linked to the xenobiotic metabolism, through the activity evaluation of the enzymes aminopirina N-demethylase, caffeine N-demethylase, antipyrine hidroxilase and aniline hidroxilase; enzyme blood levels indicating the biochemistry liver function: alanine transferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT); weekly animals weight body gain during treatment period; organs humid weight. Nandrolone decanoate administration or physical exercise to provoke none alterations in the enzyme blood levels indicating the hepatic biochemistry function, as well as in the microsomal protein dosage; they had modified humid weight of duct deferens, seminal vesicle, and kidneys; they had diminished the enzymatic activity of caffeine N-demethylase, aminopyrine N-demethylase, aniline hidroxilase and antipyrine hidroxilase; physical exercise alone or together with decanoate diminished the animals weight body gain. In conclusion, the obtained experimental results demonstrate that nandrolona decanoate administration for rats, during six

week, promotes inhibition of the liver enzymatic N-demetilação and hidroxilação activity of the animals; these alterations do not seem to have due to alterations of the hepatic cell integrity, but they could occur for inhibiting action, due to linking the metabolizing enzymes, or indirectly due to increased generation of reactive species of oxygen and increased lipid peroxidation.

# *Introdução*



Anabolizantes são derivados sintéticos da testosterona e foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar seus efeitos masculinizantes (androgênico), maximizando assim os efeitos sobre a síntese protéica e o crescimento muscular (anabólico) (HAUPT & ROVERE, 1984). São compostos por dois grupos: derivados esterificados e derivados alcalinizados. Os primeiros (propionato de testosterona, enantato de testosterona e cipionato de testosterona) são produtos para administração intramuscular e permanecem ativos por dias a semanas, enquanto os componentes do segundo grupo devem ser utilizados, por via oral, diariamente (SNYDER, 2001).

Uma vez que tanto os androgênios como os anabolizantes não têm efeitos puramente androgênicos ou anabolizantes (STURNI & DIORIO, 1998), o mais adequado é chamar a todos de esteróides anabólico-androgênicos (EAA) (American College of Sports Medicine – ACSM, 1987), denominação que utilizaremos a partir desse ponto.

Embora várias tentativas tenham sido feitas para diminuir o efeito androgênio dos esteróides anabólico-androgênicos (EAA), todos os aproximadamente 60 diferentes EAA disponíveis no mercado variam em sua estrutura química e, desse modo, sem seus destinos metabólicos e seus efeitos fisiológicos (KUHN, 2002; CLARK & HENDERSON, 2003).

A natureza química hidrofóbica dos hormônios esteróides não permite que se dissolvam facilmente nos fluídos extracelulares, sendo então transportados até o tecido alvo, via circulação sistêmica, por proteínas carregadoras específicas. Os hormônios passam através das membranas plasmáticas das células-alvo por difusão simples ligando-se a receptores específicos que podem estar no citoplasma ou no núcleo da célula. Esta ligação desencadeia alterações na conformação das proteínas receptoras (permitindo a formação de dímeros com



outros complexos do mesmo tipo), de forma que estas conseguem se ligar a seqüências de DNA altamente específicas, denominadas elementos de resposta a hormônio (Hormone Response Element - HRE). Com a ligação do dímero hormônio-receptor ao HRE, ocorre a expressão de genes específicos, adjacentes ao HRE (SNYDER, 2001).

Assim, constata-se a interação de hormônios esteróides com receptores intracelulares, que apresentam vários domínios funcionais, responsáveis pela ligação ao hormônio, ligação de alta especificidade a outras proteínas, ligação a regiões de DNA específicas e ativação da expressão gênica. Os hormônios esteróides regulam uma variedade de processos envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, crescimento e adaptação a mudanças do meio interno e ambiental (WILSON, 1996).

No ano de 1935, a testosterona foi sintetizada, pela primeira vez, por Ruzica e Weltstein e, em 1939, Boje sugeriu que os hormônios sexuais poderiam aumentar o desempenho atlético (GHAPHERY, 1995). Em 1945, houve a popularidade no meio atlético através da publicação da obra, *The Male Hormone*, do escritor Paul de Kruiff. Entretanto, o registro histórico do uso de hormônios sexuais no aumento do desempenho em campeonatos mundiais é datado de 1954, quando foram utilizados por atletas russos durante o Campeonato Mundial de Levantamento de Peso, em Viena, na Áustria (TUCKER, 1997).

Apesar dos EAA serem substâncias ilícitas e que causam inúmeros efeitos colaterais, alguns atletas procuram utilizá-los para se beneficiarem durante as competições. Isso ocorre porque quase que a totalidade dos tecidos do organismo possuem receptores para hormônios androgênicos. Um exemplo disso é que os EAA estimulam a síntese e a liberação de hemoglobina (proteína carreadora de oxigênio), aumentando a oferta de oxigênio nos tecidos, conseqüentemente melhorando o rendimento desportivo (REENTS, 2000).

Tamaki et al. (2001) relataram em estudo com animais de laboratório, que os EAA diminuem o tempo de recuperação entre as sessões de treinamento físico. Outros estudos relataram o aumento do glicogênio muscular e da síntese de proteína com conseqüente aumento da massa magra (FAHEY, 1998).

Clinicamente, os análogos sintéticos da testosterona, são indicados para o tratamento de algumas patologias, como deficiência de testosterona, algumas formas de anemias, alguns casos de câncer de mama e, ocasionalmente, em associação com estrógeno, nos sintomas de menopausa. Outras indicações aventadas, mas não suficientemente estudadas, incluem osteoporose, distúrbios sexuais e anticoncepção masculina (SHAHIDI, 2001).

Atualmente o hormônio testosterona sintética tem sido usado de forma ampla e disseminada por atletas e jovens que freqüentam as academias em busca de aquisição de um melhor vigor físico, tendo como conseqüência, um rápido aumento na massa muscular, no peso corporal e no desempenho físico (WILSON, 1988; LUKAS, 1993). Porém, não é possível garantir o uso seguro destas substâncias devido ao uso indiscriminado, aumentando o risco de efeitos tóxicos adversos que geralmente acompanham o uso dos anabolizantes esteróides. Estes efeitos podem acontecer de forma reversível ou irreversível e podem incluir problemas hepáticos, endócrinos, cardiovasculares, esqueléticos e subjetivos, como alterações de comportamento, agressividade, etc. (KIBBLE & POSS, 1987; WILSON, 1988; LUKAS, 1993) no organismo humano.

Durante as décadas de 70 e 80 pesquisadores preocupados pelo aparecimento de relatos de casos de euforia, depressão e psicose em indivíduos utilizando essas drogas (ANNITTO & LAYMAN, 1980; POPE & KATZ, 1987), lançaram-se ao estudo das alterações psiquiátricas possivelmente associadas ao uso destas substâncias. As evidências de efeitos psiquiátricos vêm de três tipos de estudos: clínicos (VOGEL et al., 1985), laboratoriais

em voluntários normais (SU et al., 1993) e, estudos naturalísticos em atletas (POPE & KATZ, 1987; TENNANT et al., 1988; DALBY, 1992; POPE & KATZ, 1994).

Trabalhos na literatura têm relacionado o abuso de EAA por atletas jovens, do sexo masculino, com diversos eventos cardiovasculares adversos, como predisposição ao mecanismo de hipercoagulabilidade, ao aumento da agregação plaquetária e à diminuição da fibrinólise (FALKENBERG et al., 1997); alargamento da parede ventricular esquerda; aumento da espessura do septo interventricular e do índice da massa do ventrículo esquerdo, porém com preservação das funções sistólicas e diastólicas normais (DI BELO, 1999); trombose ventricular e embolismo sistêmico (McCARTHY, 2000); cardiomiopatia dilatada, infarto agudo do miocárdico por oclusão da artéria descendente anterior e morte súbita por hipertrofia ventricular esquerda (FERRERA et al., 1997).

A administração de EAA em mulheres atletas resulta em alterações masculinizantes, semelhantes às observadas na puberdade masculina. Esses efeitos virilizantes indesejados incluem amenorréia, aparecimento de acne, pele oleosa, crescimento de pêlos na face, modificação na voz. Posteriormente, ocorre desenvolvimento da musculatura e do padrão de calvície masculino, além de hipertrofia do clitóris e voz grave. Com a administração contínua e prolongada, muitos desses efeitos são irreversíveis (STRAUSS et al., 1985; CSA, 1988; HARDMAN et al., 1996; RANG et al., 1997; DE ROSE & NÓBREGA, 1999;).

Quando utilizados na puberdade, causam o fechamento das epífises ósseas, acarretando deficiência do crescimento em consequência do amadurecimento ósseo precoce (CATLIN & MURRAY, 1996; DE ROSE & NÓBREGA, 1999), podendo também acarretar profunda virilização em indivíduos saudáveis (DE ROSE & NÓBREGA, 1999).

Schumacher et al. (1999) relataram o aparecimento de hematoma subcapsular e subsequente hemorragia intra-abdominal em um atleta de fisiculturismo pelo abuso de nandrolona e mesterolona. Além disso, o uso de testosterona pode causar icterícia e adenocarcinoma de fígado (HARDMAN et al., 1996; RANG et al., 1997; DE ROSE & NÓBREGA, 1999).

Considerando-se os efeitos colaterais, já observados e descritos, os dados indicam que o uso de esteróides anabólico-androgênicos pode se tornar um problema de saúde pública. Por esta razão, em 1990, o Congresso dos EUA aprovou lei que torna essas drogas medicamento de uso controlado, ou seja, que exigem receita especial, controlada pelo governo, para sua obtenção (BROWER, 1993). Entretanto graças a um mercado negro, continuam sendo obtidas à margem desse controle.

Estudos estimam que centenas de milhares de norte-americanos, muitos deles adolescentes, têm se utilizado de EAA (POPE et al., 1988; BUCKLEY et al., 1988; DURANT et al., 1993).

Ribeiro (2001) relata que milhares de jovens têm feito uso dos esteróides anabolizantes e este uso indevido tem início em jovens entre 15 e 18 anos, com maior consumo pelo sexo masculino. Dentre os indivíduos pesquisados, 2,5% relataram o uso de tais substâncias, sendo que a maioria dos usuários é esportista. A principal razão para o uso destas substâncias entre esportistas é a melhora do desempenho físico e entre não esportistas, melhora da estética.

Yesalis (1992) estima que 4% a 11% dos homens e 0,5% a 2,5% das mulheres os teriam utilizado em alguma ocasião; já entre levantadores de peso, essa proporção estaria entre 33% a 62%. Não existem estudos, no Brasil, sobre a incidência ou a prevalência do uso de EAA.

A capacidade de metabolização de endobióticos e xenobióticos depende da integridade do fígado que transforma tais substâncias em molécula mais hidrossolúveis, permitindo que elas sejam mais facilmente excretadas pelo organismo. Dessa forma, o metabolismo de substâncias químicas no fígado está envolvido primariamente na conversão de substâncias lipossolúveis em metabólitos hidrossolúveis. Este processo é chamado de biotransformação e envolve diferentes processos que utilizam enzimas hepáticas, chamados de reações de metabolização de fase I e de fase II (BENET et al., 1996).

Nas reações de fase I, grupos funcionais reativos são adicionados ou expostos (como por exemplo, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, etc.) para fornecer um sítio reativo, o qual pode ou não ser conjugado com uma substância hidrossolúvel, facilitando a sua excreção. Essas conjugações são conhecidas como reações de fase II, pela qual o metabólito da fase I é ligado covalentemente a um substrato endógeno, como por exemplo, o glutation, formando o conjugado (DELAFORGE, 1998).

Grande parte da atividade metabolizadora de drogas é encontrada no retículo endoplasmático liso (REL) e no citoplasma de determinada célula, embora também possa ocorrer, em menor grau, biotransformações nas mitocôndrias, no envoltório nuclear e na membrana plasmática. Após a homogeneização e centrifugação diferencial dos tecidos, o retículo endoplasmático se rompe e os fragmentos dessa membrana formam microvesículas chamadas microsomas. Por este motivo, as enzimas que metabolizam xenobióticos no retículo endoplasmático geralmente são classificadas como microsomais. Os sistemas enzimáticos envolvidos nas reações de fase I no fígado estão principalmente localizados no retículo endoplasmático liso da célula hepática, enquanto que os sistemas enzimáticos envolvidos nas reações de fase II localizam-se principalmente no citoplasma (BENET et al., 1996).

A enzima predominante do sistema enzimático das reações de fase I é o sistema de enzimas do citocromo P450, também referido para várias funções como sistema oxidase de função mista (MOF) ou monooxigenase. O termo Citocromo P450 refere-se a uma família de hemoproteínas localizadas no REL das células de inúmeros tecidos que catalisam inespecificamente a oxidação de uma grande variedade de compostos estruturalmente diferentes. Substratos para esse sistema enzimático incluem compostos sintetizados endogenamente, como esteróides e ácidos graxos (incluindo prostaglandinas e leucotrienos), e compostos exógenos, como drogas, conservantes de alimentos ou subprodutos industriais (OKITA & MASTERS, 2002). As reações oxidativas catalisadas pelo sistema das MOF microsomais requerem a hemoproteína do citocromo P450, a NADPH citocromo P450 redutase, o NADPH e oxigênio molecular.

As muitas formas de citocromo P450 (CYP) são classificadas, de acordo com suas similaridades de seqüência, em várias subfamílias gênicas. Membros da mesma família compartilham uma homologia de, pelo menos, 40% na seqüência de aminoácidos e membros da mesma subfamília compartilham homologia de seqüência de pelo menos 55%. A família e a subfamília são designadas por números e letras, por exemplo: CYP1A e CYP 1A2 (OKITA & MASTERS, 2002).

O fato de que os estoques de glicogênio e as enzimas que metabolizam drogas geralmente estão associados em determinadas áreas do REL sugere que exista uma relação entre ambos (DALLNER et al., 1966). Thurman & Kauffman (1980) mostraram que mudanças na atividade enzimática microsomal sobre drogas e na estrutura do REL, são geralmente acompanhadas de mudanças no conteúdo de glicogênio hepático.

Em tecidos intactos, a atividade das MOF está intimamente ligada à geração do cofator reduzido (NADPH), a qual é regulada por um sistema multienzimático que fornece NADPH

citossólico principalmente pela atividade das enzimas glicose-6-P desidrogenase e 6-P-gluconato desidrogenase, em uma série de reações complexas iniciadas com a glicose-6-P, formada com a quebra do glicogênio (ciclo das pentoses fosfato) (THURMAN & KAUFFMAN, 1980).

Muitos fatores podem influenciar tanto o metabolismo hepático quanto o efeito das substâncias químicas hepatotóxicas, normalmente por interação com as MOF ou outra reação de fase I, sendo que em muitos casos, a indução do sistema oxidase de função mista citocromo P450, pode conduzir à maior produção de um metabólito ativo favorecendo uma via de biotransformação que conduz àquele produto tóxico (DOUIDAR et al., 1992).

A função do sistema de enzimas do citocromo P450 pode ser modificada em muitas vias, podendo ser induzido por muitas drogas como o fenobarbital e o benzopireno, mas muitos outros xenobióticos também produzem indução desse sistema. Histologicamente, a proliferação do REL ocorre predominantemente na região centrolobular do fígado, quando a indução do sistema oxidase de função mista ocorre. Indutores deste sistema incluem os esteróides sintéticos, etanol, 1,1,1-tricloroetano, polihalogenados aromáticos, etc. (SIPES, 1986).

Apesar do efeito benéfico dos exercícios físicos já ser bem reconhecido esta premissa está agora sendo revista na literatura atual, uma vez que eles também possuem potencial para provocar possíveis efeitos negativos. Esse potencial deve-se ao fato de que o metabolismo aeróbico elevado durante exercício físico aumenta a produção de radicais livres no organismo. O radical livre é qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais que um elétron livres de sua órbita externa. Esses elétrons livres ou não pareados têm grande instabilidade química, e mesmo tendo meia vida de frações de segundos, são altamente reativos e capazes de reagir com qualquer composto, seja ele uma molécula, célula ou tecidos de nosso

organismo, produzindo reações de danos celulares em cadeia. No entanto, o radical livre tem papel importante para o organismo, atuando no processo respiração celular que ocorre nas mitocôndrias (geração de ATP) e na proteção contra microorganismos (HALLWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Os radicais livres apresentam grande reatividade, significando que podem reduzir os elétrons de compostos como proteínas de DNA, proteínas celulares e lipídios, promovendo conseqüentemente danos ao sistema biológico causados pelo estresse oxidativo, trazendo riscos à saúde do indivíduo (HALLWELL & CHIRICO, 1993).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

Considerando que não é possível garantir o uso seguro dos anabolizantes, devido ao uso indiscriminado de agentes variados e em altas doses, aumentando o risco de efeitos tóxicos e, que alguns desses efeitos não são reversíveis e não há estudos em médio e longo prazo, principalmente sobre o fígado, resolvemos estudar experimentalmente em ratos os efeitos hepatotóxicos de um desses agentes, considerado um dos mais utilizados em nosso meio, o decanoato de nandrolona associando-o ao efeito provocado pelo estresse gerado pelo exercício físico de corrida.



# *Objetivo*



**Geral** - avaliar aspectos da toxicidade e especificamente da hepatotoxicidade do anabolizante decanoato de nandrolona em ratos submetidos ao exercício físico.

**Específicos** - avaliar, nos animais expostos ao decanoato de nandrolona e submetidos ao exercício físico, os seguintes parâmetros:

- Atividade enzimática do sistema microsomal hepático, citocromo P450-dependente, ligada à metabolização de xenobióticos, através da avaliação da atividade das enzimas aminopirina N-demetilase, cafeína N-demetilase, antipirina hidroxilase e anilina hidroxilase.
- Níveis sanguíneos de enzimas indicadoras da integridade da membrana do hepatócito: Alanina Transferase (ALT), Aspartato Transaminase (AST), Fosfatase Alcalina (ALP) e Gama-Glutamil Transferase (GGT).
- Efeitos do exercício físico de corrida sobre a metabolização hepática de drogas.
- Ganho de peso corporal dos animais no período de tratamento.
- Peso úmido dos órgãos.

# *Material e Métodos*



### ***1-Animais e ambiente de experimentação***

Foram utilizados no estudo ratos Wistar machos, adultos (70 dias), provenientes do Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu. Durante todo o período de crescimento após o desmame e o experimental, os animais permaneceram no biotério do Centro de Pesquisas Experimentais da Faculdade de Medicina, UNESP de Botucatu. Ficaram alojados em gaiolas coletivas, com 4 ou 3 animais cada, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $55 \pm 10\%$ ), ciclo de luz invertido de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição em ambiente sanitariamente controlado.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### ***2-Drogas e reagentes***

-Decanoato de nandrolona 25 mg (Deca Durabolin®): Organon

-Aminopirina - Sigma

-Anilina - Sigma

-Cafeína - Acros

-Antipirina - Sigma

-NADP (nicotinamida-adenina dinucleotídeo) - Sigma

-G-6-PNa<sub>2</sub> - Sigma

-Nicotinamida - Sigma

Os demais reagentes utilizados foram adquiridos da mais alta pureza encontrada no mercado.

-Folin-fenol

-Sulfato de cobre 1%

-Tartarato de sódio/potássio 2%

-Carbonato de sódio 10%

-KCl-fosfato a 1,15%

-Albumina Bovina (BSA)

-Glicose-6-fosfato sódica (G-6-PNa<sub>2</sub>)

-Glicose-6-fosfato de bário (G-6-PBa)

-Sulfato de sódio anidro

-BaSO<sub>4</sub>

-Cloreto de semicarbazida

-Cloreto de Magnésio

-Sulfato de Zinco 15%

-Hidróxido de Bário

-Acetato de Amônio

-Acetil-acetona

-Ácido Tricloroacético 20% (TCA)

-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%

-Fenol 2%

-Ácido Sulfúrico

-Nitrito de Sódio 0,2%

-Cloreto de Magnésio Heptahidratado

### ***3-Grupos Experimentais***

Após o período de aclimatação os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais com 7 animais em cada grupo:

3.1 *Não treinado e não tratado (NTNT)*: os animais desse grupo receberam somente a aplicação do veículo (óleo de milho), em volume semelhante aos dos grupos que receberam decanoato de nandrolona;

3.2 *Não treinado e tratado (NTT)*: os animais desse grupo receberam decanoato de nandrolona e não foram submetidos ao exercício físico;

3.3 *Treinado não tratado (TNT)*: os animais foram submetidos ao protocolo de exercício físico de corrida (tabela1) e receberam somente a aplicação do veículo (óleo de milho);

3.4 *Treinados e tratado (TT)*: os animais deste grupo foram submetidos ao protocolo de exercício físico de corrida (tabela 1) e receberam decanoato de nandrolona.

### ***4-Tratamento***

Os animais tratados com o decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) receberam o anabolizante na dose de 5mg/kg de peso corporal, durante 6 semanas, duas vezes por semana, entre 11:00 e 11:30h, via intramuscular, músculo da pata traseira de forma alternada. Esta dose tem sido relatada como equivalente às doses geralmente utilizadas por atletas, 600mg/semana ou aproximadamente 8mg/kg/semana, em academias (POPE & KATZ, 1988).

## ***5- Programa de exercício físico de corrida***

### *5.1- Adaptação*

Para minimizar o efeito do estresse pelos primeiros contatos com a esteira, antes do início das sessões de corrida, os ratos foram submetidos a duas semanas de adaptação na esteira durante cinco minutos na velocidade de 5 m/min sem inclinação (GEORGIEVA & BOYADJIEV, 2004).

### *5.2 - Protocolo de exercício físico de corrida*

O treinamento dos animais na esteira foi baseado no protocolo preconizado por Georgieva & Boyadjiev (2004) utilizando a velocidade de 27 m/min, com 5° elevação (70-75%  $VO_2$  máx), 3-4 dias por semana, durante as 6 semanas de tratamento dos animais. A duração das sessões de exercício foi de 20 min no primeiro dia, sendo aumentado cinco minutos por dia até atingir 40 minutos (tabela 1), tempo esse que foi mantido até o fim das 6 semanas.

Os animais pertencentes aos grupos sedentários (SNT e ST) foram colocados uma vez por semana na esteira, por 5 minutos para simular algum efeito da manipulação.

Para a realização do protocolo de exercício físico de corrida dos animais utilizou-se a esteira elétrica adaptada para ratos (Fig. 1), do biotério do Centro de Pesquisas Experimentais – Laboratório de Clínica Médica - da Faculdade de Medicina, UNESP de Botucatu.



A



B



C



D

**Figura 1.** Esteira elétrica adaptada, utilizada para realização do protocolo de exercício de corrida. [A] – visão lateral externa, [B] – visão das cinco raias de corrida, [C] – visão frontal externa, [D] – visão do painel de controle de velocidade e inclinação da esteira.



**Tabela 1:** Protocolo de exercício físico de corrida dos animais

<b>Semana</b>	<b>Dias de Treinamento</b>	<b>Velocidade da Esteira (m/min)</b>	<b>Grau de inclinação da Esteira</b>	<b>Tempo de corrida (min)</b>
<b>1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> semanas</b>	adaptação	5	0	5
<b>3<sup>a</sup> semana</b>	1 <sup>o</sup>	27	5	20
	2 <sup>o</sup>	27	5	25
	3 <sup>o</sup>	27	5	30
<b>4<sup>a</sup> semana</b>	4 <sup>o</sup>	27	5	35
	5 <sup>o</sup>	27	5	40
	6 <sup>o</sup>	27	5	40
	7 <sup>o</sup>	27	5	40
<b>5<sup>a</sup> semana</b>	8 <sup>o</sup> - 10 <sup>o</sup>	27	5	40
<b>6<sup>a</sup> semana</b>	11 <sup>o</sup> -14 <sup>o</sup>	27	5	40
<b>7<sup>a</sup> semana</b>	15 <sup>o</sup> -17 <sup>o</sup>	27	5	40
<b>8<sup>a</sup> semana</b>	18 <sup>o</sup> -21 <sup>o</sup>	27	5	40

## **6-Parâmetros Gerais Avaliados**

6.1 - *Peso dos animais*: Os animais foram pesados uma vez por semana e ao final do experimento.

6.2 - *Peso úmido dos órgãos*: quando da retirada do fígado, para avaliar a atividade de metabolização, pensando num maior aproveitamento dos tratamentos dos animais para fornecer dados adicionais sobre este tipo de exposição, realizou-se também a retirada dos rins, coração, testículos, próstata porção ventral, vesícula seminal sem secreção e secreção contida na vesícula, glândula adrenal, ducto deferente e epidídimo, para avaliação do peso úmido.

## **7-Avaliação do Efeito do Tratamento sobre o Fígado**

7.1 – *Peso úmido do fígado*.

7.2 - *Dosagem das enzimas Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transferase (ALT), Fosfatase Alcalina (ALP) e Gama Glutamil Transferase (GGT)*: Uma parte do sangue retirado dos animais foi utilizada para separar o soro, no qual foram realizadas as dosagens dos níveis das enzimas Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transferase (ALT), Fosfatase Alcalina (ALP) e Gama Glutamil Transferase (GGT) utilizando-se *kits* reativos específicos. Estas dosagens foram feitas no Laboratório Clínico, da Faculdade de Medicina - Unesp de Botucatu.

### 7.3 Preparação dos Extratos Enzimáticos de fígado (MAZEL, 1971):

#### a) Extrato Enzimático:

Os animais foram anestesiados com éter e mortos por exsanguinação em guilhotina, tendo os seus fígados removidos, pesados e em seguida picados com tesoura fina e colocados à temperatura de gelo (todas as etapas posteriores foram completadas à baixa temperatura). O homogenato foi preparado colocando-se dois grama de fígado em 7 ml de tampão isotônico KCl-fosfato (KCl a 1,15% em tampão fosfato 0,01 M, pH=7,1) e triturado em homogeneizador Potter, a 1000rpm. O homogenato foi centrifugado (centrífuga modelo Sorvall) a 10.000 x g, a 5°C, durante 10 minutos para remoção de resíduos celulares, núcleo e mitocôndrias. Parte do sobrenadante dessa fração centrifugada, contendo microsomas e proteínas solúveis, foi conservado à temperatura do gelo até o momento do uso e utilizado para análise da atividade enzimática *in vitro* (cada ml desta suspensão continha aproximadamente, 125 mg de tecido hepático) e a outra parte do sobrenadante foi recentrifugada a 105.000 x g, durante 60 minutos, para dosagem de proteína microsomal.

#### b) Meio de Incubação:

- Solução de Cofatores: Glicose-6-fosfato sódica (G-6-PNa<sub>2</sub>), sal adquirido comercialmente sob a forma de G-6-PBa que é uma molécula mais estável mas inadequado para ser adicionado ao meio de incubação, e que para ser empregado deve ser convertido em sal sódico; para tanto, 4mg (10µmol) de G-6-PBa foram triturados com 1,7mg de sulfato de sódio anidro e ressuspendido em 3,3ml de tampão fosfato a 0,5M, pH=7,4 sendo posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 1000rpm e o sobrenadante separado do BaSO<sub>4</sub>. Deste sobrenadante contendo a G-6-PNa<sub>2</sub> foram separados 3ml e a eles adicionados

0,48mg (0,65 $\mu$ mol) de NADP (nicotinamida-adenina dinucleotídeo), 7mg (50 $\mu$ mol) de nicotinamida e 5mg (45 $\mu$ mol) de cloreto de semicarbazida.

- Extrato Enzimático: 2,0ml da fração sobrenadante 10.000 x g.

*7.4 – Determinação de Proteínas:* a determinação da concentração de proteína no tecido microsomal hepático foi realizada segundo Lowry et al. (1951).

Reagentes:

Folin-fenol: 5ml do reagente folin-fenol foram diluídos com 50ml de água destilada.

Reagente de Cobre: solução composta de 1ml de sulfato de cobre a 1%, 1ml de tartarato de sódio/potássio a 2% e 20ml de carbonato de sódio 10% em NaOH a 0,5M.

Dosagem:

Preparação das amostras: 0,32ml do sobrenadante do centrifugado de 10000 X g do homogenato de fígado foram diluídos em 50ml de KCl a 1,15% em tampão fosfato a 0,01M.

Foram utilizados tubos de ensaio contendo 1ml das amostras sendo acrescentado 1ml do reagente de cobre, deixando-se reagir em temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 3ml do reagente Folin-fenol sob contínua agitação, e os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro UV-Vis a 540nm, contra branco correspondente.

A quantidade de proteína presente foi calculada utilizando-se como referência a curva padrão feita com albumina bovina. O valor obtido da densidade óptica foi dividido por 0,8 (corrigindo-se a diluição feita nas amostras correspondentes) para obter a quantidade de proteína existente em mg de proteína/g de tecido.

### Preparação da Curva Padrão de Proteína:

Uma solução mãe de albumina bovina (BSA) na concentração de 200µg/ml, foi preparada e diluída em água destilada para se obter as concentrações de 150, 100 e 50µg/ml. Transferiu-se 1ml dessas soluções para tubos de ensaio e acrescentou-se 1ml do reagente de cobre, deixando reagir em temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 3ml do reagente Folin-fenol sob contínua agitação e os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A densidade óptica lida em espectrofotômetro UV-Vis a 540nm, contra branco correspondente.

### *7.5 – Avaliação in vitro da Atividade Enzimática da Fração Microsomal Hepática:*

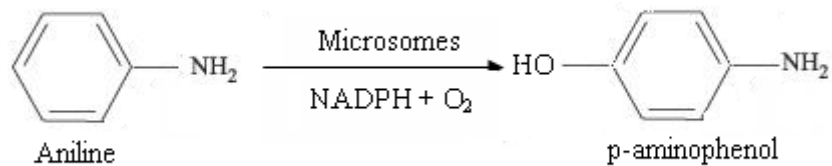
#### Atividade das Enzimas Microsomais:

A atividade das enzimas microsomais foi avaliada pela taxa de metabolização dos substratos específicos, como descritos a seguir:

- *Determinação da Atividade da Enzima Anilina Hidroxilase Microsomal – estimada pela quantidade do p-aminofenol produzido (MAZEL, 1971).*

A conversão metabólica da anilina é feita principalmente pelo CYPs 2E1 (RAUCY, 1995).

A taxa do metabolismo in vitro da anilina pode ser determinado medindo a quantidade de p-aminofenol formado, de acordo com a seguinte reação:



### Incubação:

Solução de substrato: 0,7mg (5 $\mu$ moles) de anilina (hidrocloreto) foram dissolvidos em 1ml de água destilada contendo 6mg de cloreto de magnésio (25 $\mu$ moles).

Para a incubação foram misturados 1ml da solução de substrato com 3ml da solução da mistura de cofatores (sem cloreto de semicarbazida) e com 2ml do extrato enzimático, em frasco de Erlenmeyer de 25ml. Os frascos com substratos foram incubados em incubador metabólico Dubnoff com agitação de 120 ciclos por minuto, durante 20 minutos a 37°C, tendo oxigênio do ar como fonte gasosa. (volume total da incubação: 6ml).

### Determinação do p-aminofenol:

Ao fim do período de incubação, sob agitação, a reação foi terminada pela adição de 2,0ml de ácido tricloroacético (TCA) a 20%. O conteúdo de cada frasco foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado a 3000 X rpm por 15 minutos. Do sobrenadante, 2ml foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 1,0ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%), sob agitação, mais 2ml de fenol a 2% em NaOH (0,2N). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 30 minutos e aguardou-se o desenvolvimento da cor. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 640nm utilizando o branco correspondente do tecido para zerar o aparelho.

As quantidades de p-aminofenol presentes foram calculadas utilizando-se como referência a curva padrão. O número obtido foi multiplicado por 3 para obter a quantidade total de p-aminofenol nos frascos de incubação. Este número foi multiplicado por 6 para obter o resultado em  $\mu\text{g}$  de p-aminofenol formado/g de tecido/20min, o resultado obtido foi dividido pela quantidade de proteína (mg) e multiplicado por 3 para obter o resultado em  $\mu\text{moles}$  de p-aminofenol formado/mg de proteína/hora.

#### Preparação da Curva padrão de p-aminofenol:

Foram preparados uma série de tubos contendo p-aminofenol HCl ( $1\text{-}4\mu\text{g/mol}$ ) em 2,0ml de ácido tricloroacético a 6,67% pois esta era a concentração final de TCA nos frascos de incubação. Para cada alíquota de 2,0ml das soluções contendo p-aminofenol, foi adicionado 1ml de carbonato de sódio 10%, sob agitação, mais 2,0ml de fenol à 2% em NaOH (0,2N). Os tubos foram colocados em banho-maria à 37°C por 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 640nm utilizando o branco correspondente do tecido para zerar o aparelho.

*Determinação da atividade da Enzima Antipirina Hidroxilase Microsomal – estimada pelo desaparecimento do substrato (BRODIE & AXELROD, 1950).*

A conversão metabólica da antipirina é feita principalmente pelos CYPs 1A2, 2B1/2 e 3A1 (BLANCHARD et al., 2004).

A atividade de metabolização da antipirina hidroxilase foi avaliada pela quantificação, in vitro, da antipirina não hidroxilada.

#### Incubação:

Solução de substrato: 1,9mg de antipirina (5 $\mu$ moles) foram dissolvidos em 1 ml de água destilada contendo cloreto de magnésio (25 $\mu$ moles).

Para incubação foram misturados 1ml da solução de substrato com 3ml da solução da mistura de cofatores e com 2ml do extrato enzimático, em frasco de Erlenmeyer de 25ml. Os frascos com substratos foram incubados em incubador de Dubnoff com agitação de 120 ciclos por minuto, durante 30 minutos a 37°C, tendo oxigênio do ar como fonte gasosa. (volume total da incubação: 6ml).

#### Procedimento para dosagem da antipirina não hidrolizada:

Ao fim do período de incubação, sob agitação, as reações foram terminadas pela adição de 2,0ml de ácido tricloroacético (TCA) a 20%. O conteúdo de cada frasco foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado a 3000 X g por 15 minutos. Do sobrenadante 3ml foram transferidos para tubos de ensaio, adicionados 0,25ml de ácido sulfúrico a 4N e 0,02ml de solução recém preparada de nitrito de sódio a 0,2%. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro UV-Vis após 20 minutos a 350nm, contra branco correspondente.

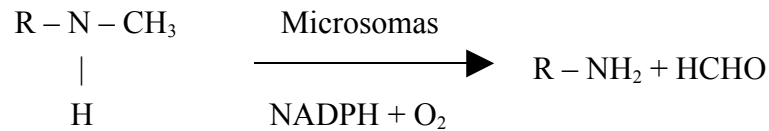
A quantidade de antipirina não-hidrolizada presente foi calculada utilizando-se como referência a curva padrão. O valor obtido da densidade óptica foi multiplicado por 2 para obter a quantidade total de antipirina nos frascos de incubação. A quantidade total de antipirina não hidrolizada multiplicada por 4 e dividido pelo peso molecular da antipirina (188,2) resultou em  $\mu$ moles de antipirina não hidrolizados/g de tecido/por 30min. Este número foi dividido pela quantidade de proteína (mg) e multiplicado por 2 para obter o resultado em  $\mu$ moles de antipirina não hidrolizados/ mg de proteína/ hora.

#### Preparação da Curva Padrão de Antipirina:



As soluções padrão foram preparadas colocando-se em 3ml de solução de ácido sulfúrico a 0,07N, concentrações conhecidas (5, 10, 20 e 40  $\mu\text{g/ml}$ ) de antipirina. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro Uv-Vis a 350 nm, após 20 minutos da adição de 0,02ml de solução recém preparada de nitrito de sódio.

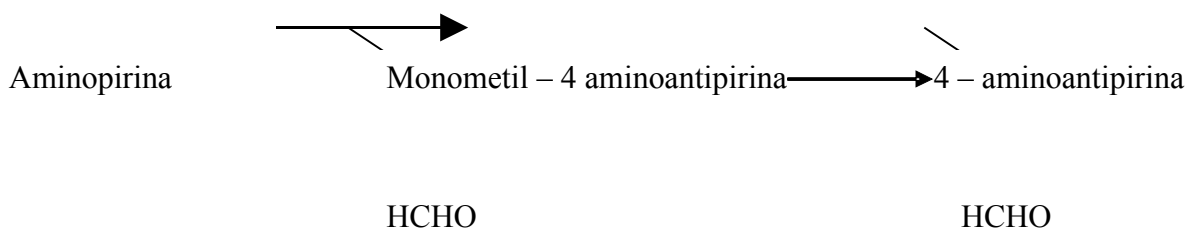
Aminopirina e a cafeína são dois compostos desalquilados pelas enzimas microsomais do fígado, de acordo com a seguinte equação geral:



A taxa do metabolismo hepático dessas drogas poderia ser medida pelo desaparecimento do composto original, pela formação do produto demetilado ou pela quantidade de formaldeído (HCHO) produzido na reação de metabolização.

A conversão metabólica da aminopirina é feita principalmente pelos CYP 1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E11 e 2C12 (WEI et al., 1995).

A medida desta conversão é baseada na seguinte reação:

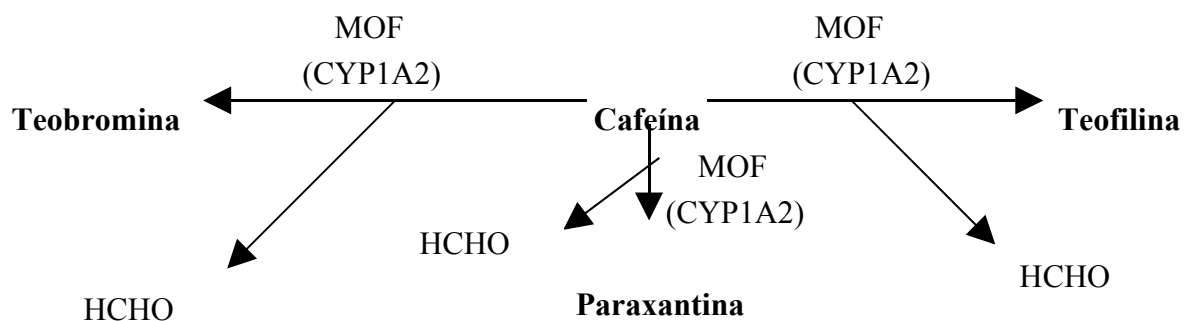


Neste caso, o desaparecimento da aminopirina ou a formação da monometil-4-aminoantipirina (metabólito primário) não devem ser utilizados como uma medida de desalquilação, já que quantidades apreciáveis desses substratos desaparecem em vias alternativas. Por este motivo, o método mais adequado para estudar a N-demetilação da aminopirina é através da quantificação de formaldeído produzido (Mazel, 1971).

Quanto à cafeína, durante sua conversão metabólica no fígado, são gerados 17 metabólitos no total (CHUNG et al., 1998), porém apenas três deles surgem por desalquilação: paraxantina (N-3 demetilação), teobromina (N-1 demetilação) e teofilina (N-7 demetilação) numa extensão de 80%, 11% e 4% respectivamente (JODYNIS-LIEBERT & MATUSZWSKA, 1999; WOODIN et al., 2000). Deste modo tanto o desaparecimento da cafeína (ref.) quanto a geração das três xantinas ou a produção de formaldeído poderiam ser utilizados como índice da extensão da ação metabolizadora hepática. Neste caso, no nosso experimento, optamos por avaliar também para a metabolização da cafeína, a quantidade de formaldeído produzido pela reação de N-demetilação.

A conversão metabólica da cafeína é feita principalmente pelo CYP 1A2, e 1A1/2 (CHUNG et al, 1998).

A medida desta conversão é baseada na seguinte reação:



- *Determinação da Atividade da Enzima Aminopirina N-Demetilase Microsomal – estimada pela quantidade do formaldeído produzido (Mazel, 1971).*

#### Incubação:

Solução de substrato: 1,5mg (5 $\mu$ moles) de aminopirina foram dissolvidos em 1 ml de água destilada contendo 6mg de cloreto de magnésio heptahidratado (25 $\mu$ moles).

Para a incubação foram misturados 1 ml da solução de substrato em 3ml da solução da mistura de cofatores e com 2ml do extrato enzimático, em frasco de Erlenmeyer de 25ml. Os frascos com substratos foram incubados em incubador metabólico Dubnoff com agitação de 120 ciclos por minuto, durante 30 minutos a 37°C, tendo oxigênio do ar como fonte gasosa. (Volume total da incubação: 6ml).

#### Determinação do Formaldeído Produzido:

Ao fim do período de incubação, a reação foi determinada pela adição, sob agitação, de 2ml de sulfato de zinco a 15%; após 5 minutos foram adicionados 2ml de solução saturada de hidróxido de bário, sendo o conteúdo de cada frasco, após a agitação, transferido para tubos de centrifugação e centrifugado a 3.000 X g por 10 minutos. Do sobrenadante, 5 ml foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 2ml do reagente de Nash (30g de acetato de amônio, 0,4ml de acetil acetona e água destilada q.s.p. 100ml), sob agitação. Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C durante 30 minutos; as soluções que apresentaram turvação foram filtradas em papel Whatman nº 1 colocado sob funil de

vidro. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 415 nm utilizando o branco correspondente do tecido para zerar o aparelho.

As quantidades de formaldeído presentes foram calculadas utilizando-se como referência a curva padrão. O valor obtido da densidade óptica foi multiplicado por 2 para obter a quantidade total de formaldeído no frasco. A quantidade total de formaldeído foi multiplicado por 4 e dividido pelo peso molecular do formaldeído (30) resultando em  $\mu$ moles de formaldeído formado/g de tecido/ 30 min. O número obtido foi dividido pela quantidade de proteína formada (mg) e multiplicado por 2 para transformar o resultado em  $\mu$ moles de formaldeído produzido/mg de proteína/hora.

#### Preparação da Curva Padrão do Formaldeído:

O formaldeído em solução a 37,4% foi diluído em água destilada para se obter as concentrações de: 4, 2, 1 e 0,5 $\mu$ g/ml (com duplicatas). Porções de 5 ml de cada solução foram transferidas para tubos de ensaio (branco com 5 ml de água destilada), sendo posteriormente adicionados à solução 2,0ml do reagente de Nash e colocados em banho-maria à 60°C por 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 415nm contra o branco correspondente.

- *Determinação da Atividade da Enzima Cafeína N-Demetilase Microsomal – estimada pela quantidade do formaldeído produzido* (BUTLER et al., 1989; CHUNG et al., 1998).

#### Incubação:

Solução de substrato: 126mg (13 $\mu$ moles) de cafeína foram dissolvidos em 50 ml de água destilada contendo 300mg de sulfato de magnésio heptahidratado (0,51 $\mu$ moles).

Para a incubação foram misturados 1ml da solução de substrato em 3ml da solução da mistura de cofatores e com 2ml do extrato enzimático, em frasco de Erlenmeyer de 25ml. Os frascos com substratos foram incubados em incubador metabólico Dubnoff com agitação de 120 ciclos por minuto, durante 30 minutos a 37°C, tudo oxigênio do ar como fonte gasosa. (Volume total da incubação: 6ml).

#### Determinação do Formaldeído Produzido:

Ao fim do período de incubação, a reação foi determinada pela adição, sob agitação, de 2ml de sulfato de zinco a 15%; após 5 minutos foram adicionados 2ml de solução saturada de hidróxido de bário, sendo o conteúdo de cada frasco, após a agitação, transferido para tubos de centrifugação e centrifugado a 3.000 X g por 10 minutos. Do sobrenadante, 5 ml foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 2ml do reagente de Nash (30g de acetato de amônio, 0,4ml de acetil acetona e água destilada q.s.p. 100ml), sob agitação. Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C durante 30 minutos; as soluções que apresentaram turvação foram filtradas em papel Whatman nº 1 colocado sob funil de

vidro. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 415 nm utilizando o branco correspondente do tecido para zerar o aparelho.

As quantidades de formaldeído presentes foram calculadas utilizando-se como referência a curva padrão. O valor obtido da densidade óptica foi multiplicado por 3 para se obter a quantidade total de formaldeído no frasco. A quantidade total de formaldeído foi multiplicado por 4 e dividido pelo peso molecular do formaldeído (30) resultando em  $\mu$ moles de formaldeído formado/g de tecido/ 30 min. O número obtido foi dividido pela quantidade de proteína formada (mg) e multiplicado por 2 para transformar o resultado em  $\mu$ moles de formaldeído formado/mg de proteína/hora.

#### Preparação da Curva Padrão do Formaldeído:

O formaldeído em solução a 37,4% foi diluído em água destilada para se obter as concentrações de: 4, 2, 1 e 0,5 $\mu$ g/ml (com duplicatas). Porções de 5 ml de cada solução foram transferidas para tubos de ensaio (branco com 5 ml de água destilada), sendo posteriormente adicionados à solução 2,0ml do reagente de Nash e colocados em banho-maria à 60°C por 30 minutos para o desenvolvimento da cor. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 415nm contra o branco correspondente.

#### ***8-Análise Estatística***

Os resultados experimentais obtidos em cada grupo de tratamento foram comparados estatisticamente através do programa INSTAT 3.0 (GraphPad Software) utilizando-se análise de variância (ANOVA) complementada, *a posteriori*, com o teste de Tukey-Kramer sempre que encontrado  $p < 0,05$  (SNEDECOR & COCHRAN, 1980).

# *Resultados*

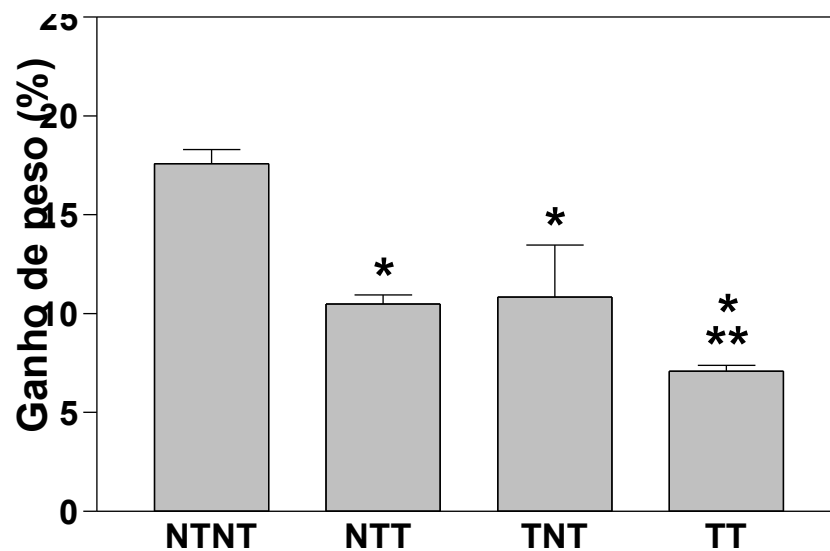




A seguir serão apresentados os resultados referentes às análises experimentais realizadas em ratos adultos não treinados ou submetidos ao exercício físico de corrida em esteira adaptada, tratados com veículo ou EAA, compreendendo quatro grupos experimentais: não treinado e não tratado (controle), não treinado e tratado, treinado não tratado e treinado e tratado. Após o período de duas semanas para adaptação dos animais na esteira iniciou-se o protocolo de exercício físico assim como o de tratamento dos animais.

### 1. Média do Ganho de Peso Semanal

**Figura 2:** Ganho de peso semanal médio de animais recebendo decanoato de nandrolona e realizando exercício físico.



Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

\* $P < 0.05$  –  $P < 0.01$  of NTNT \*\* $P < 0.05$  of NTT (Tuckey-Kramer).

A figura 2 apresenta o ganho de peso (%) de ratos adultos dos grupos NTNT, NTT, TNT e TT. Observa-se uma queda estatisticamente significativa no percentual de ganho de

peso nos grupos não treinado e tratado, treinado não tratado e treinado e tratado em relação ao grupo não treinado e não tratado, e no e tratado treinado, em relação ao não treinado e tratado.

## 2. Peso úmido relativo dos órgãos

### 2.1 Peso úmido relativo do fígado, da glândula adrenal, do coração e dos rins

**Tabela 2:** Peso úmido relativo de órgãos e glândula adrenal de ratos não treinados ou treinados e nos que receberam decanoato de nandrolona ou veículo.

	Grupos			
	NTNT	NTT	TNT	TT
<b>Fígado</b>	2,958±0,116	3,035±0,160	2,960±0,103	3,036±0,056
<b>Adrenal</b>	0,007±0,0005	0,007±0,0007	0,007±0,0009	0,007±0,0005
<b>Coração</b>	0,316±0,008	0,343±0,018	0,316±0,303	0,355±0,008
<b>Rins</b>				
<b>direito</b>	0,274±0,008	0,353±0,018 <sup>δ</sup>	0,28±0,013 <sup>£</sup>	0,349±0,010 <sup>δ π</sup>
<b>esquerdo</b>	0,277±0,007	0,344±0,017 <sup>δ</sup>	0,272±0,005 <sup>£</sup>	0,349±0,011 <sup>δ π</sup>

Valores são expressos como a média ± EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado. <sup>δ</sup> p<0,05 do NTNT <sup>£</sup> p<0,05 do NTT <sup>π</sup> p<0,05 do TNT (Tuckey-Kramer).

Na tabela 2 observa-se que não houve diferenças estatisticamente significantes no peso do fígado, da glândula adrenal e do coração. Houve um aumento estatisticamente significativo

no peso úmido dos rins D e E no grupo não treinado tratado em relação ao não treinado e não tratado, assim como no peso de ambos os rins no grupo tratado e treinado em relação ao grupo não treinado e não tratado e treinado não tratado. O grupo treinado não tratado apresentou diminuição estatisticamente significativa no peso dos rins D e E em relação ao grupo não treinado tratado.

## 2.2 Peso úmido relativo de genitais internos e acessórios de ratos adultos

**Tabela 3:** Peso úmido relativo de genitais internos e acessórios de ratos não treinados ou treinados e nos que receberam decanoato de nandrolona ou veículo.

	<b>Grupos</b>			
	<b>NTNT</b>	<b>NTT</b>	<b>TNT</b>	<b>TT</b>
<b>Próstata</b>	0,110 ±0,012	0,114±0,008	0,112±0,015	0,134±0,014
<b>Testículos</b>				
<b>direito</b>	0,354±0,021	0,354±0,022	0,363±0,018	0,318±0,014
<b>esquerdo</b>	0,350±0,020	0,354 ±0,023	0,363±0,020	0,313±0,015
<b>Epidídimo</b>	0,143±0,006	0,150±0,009	0,146 ±0,006	0,143±0,007
<b>Ducto deferente</b>	0,014±0,001	0,019±0,001	0,015 ±0,001	0,023±0,002 <sup>δπ</sup>
<b>Vesícula Seminal</b>				
<b>sem secreção</b>	0,045±0,003	0,061±0,006 <sup>δ</sup>	0,046±0,003	0,055±0,005
<b>secreção contida</b>	0,398±0,032	0,560±0,038	0,394±0,045 <sup>ξ</sup>	0,526±0,052

Valores são expressos como a média ± EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

<sup>δ</sup>p<0,05 do NTNT    <sup>ε</sup>p<0,05 do NTT    <sup>π</sup>p<0,05 do TNT    (Tuckey-Kramer).

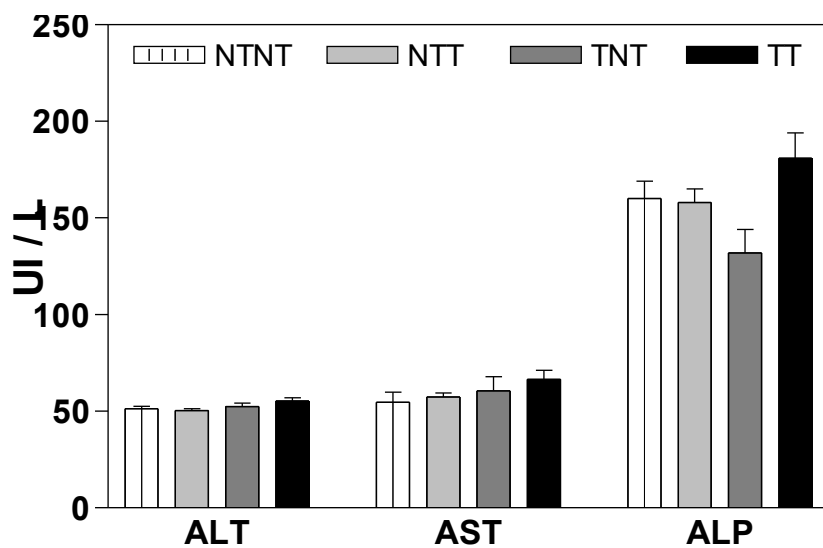
Na tabela 3 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa no peso da próstata, dos testículos direito e esquerdo e do epidídimo. Houve um aumento estatisticamente significativo do peso úmido do ducto deferente no grupo tratado e treinado em relação ao grupo não treinado e não tratado e treinado não tratado. Observa-se um aumento estatisticamente significativo no peso da vesícula seminal sem secreção no grupo não treinado e tratado em relação ao grupo não treinado e não tratado. Em relação à secreção contida na vesícula seminal observou-se um aumento da secreção seminal no grupo não treinado e tratado em relação ao grupo treinado não tratado.

### **3. Função bioquímica do fígado**

#### **3.1 Atividade das enzimas - Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transferase (ALT), Fosfatase Alcalina (ALP) e Gama-Glutamil Transferase (gama-GT), no plasma.**

Na dosagem da enzima gama-GT no plasma dos animais observou-se que não houve diferenças entre os valores obtidos nos grupos de tratamento (<5,0 U/L para todos os grupos)

**Figura 3:** Concentração das enzimas (U/L) Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transferase (ALT), Fosfatase Alcalina (ALP) nos ratos não treinados ou treinados e nos que receberam EAA ou veículo.

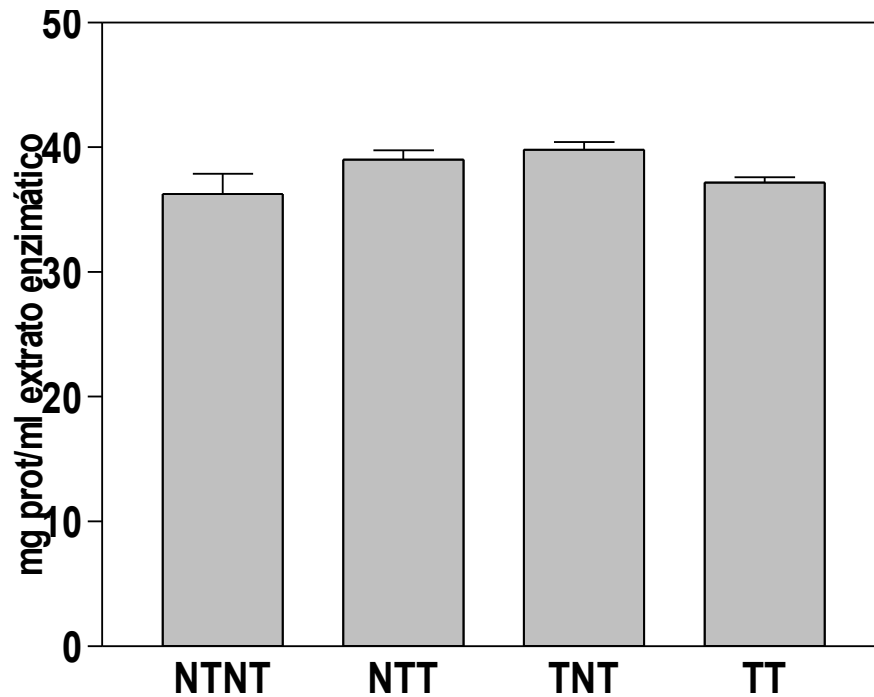


Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT= não treinado e não tratado; NTT= não treinado tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado. Comparação estatística através de ANOVA.

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa na concentração das enzimas AST, ALT e ALP.

#### ***4. Dosagem de proteína na fração microsomal hepática***

**Figura 4:** Dosagem de proteína microsomal em fígado de ratos não treinados ou treinados e que receberam decanoato de nandrolona ou veículo.



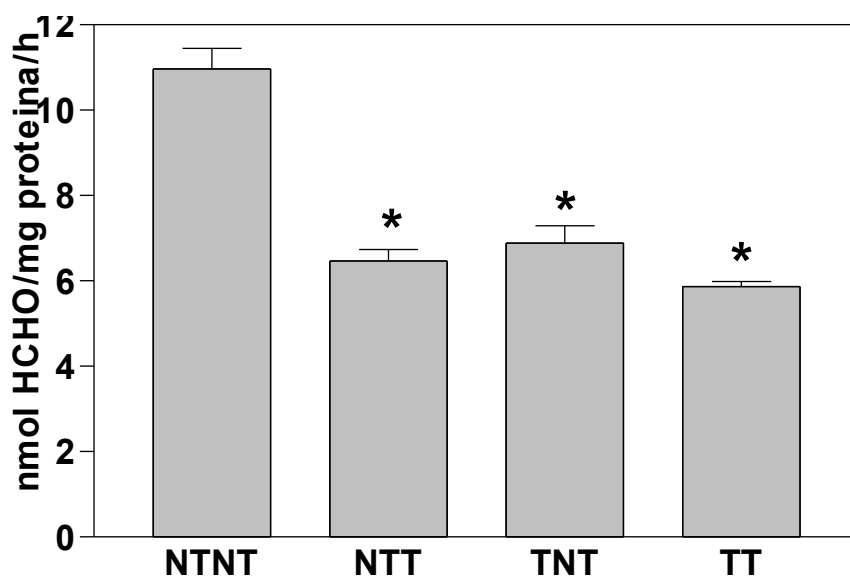
Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT= não treinado e não tratado; NTT= não treinado tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado. Comparação estatística através de ANOVA.

Na figura 4 observa-se que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa na dosagem de proteína microsomal nos fígados dos ratos dos grupos experimentais.

## 5. Atividade enzimática do sistema microsomal hepático

### 5.1 Cafeína N-demetilase

**Figura 5:** Efeito do decanoato de nandrolona e exercício físico sobre a atividade da enzima Cafeína N-demetilase em fígado de ratos não treinados ou treinados e que receberam decanoato de nandrolona ou veículo, avaliado pela quantidade de formaldeído (HCHO) produzido pela reação de metabolização do substrato.



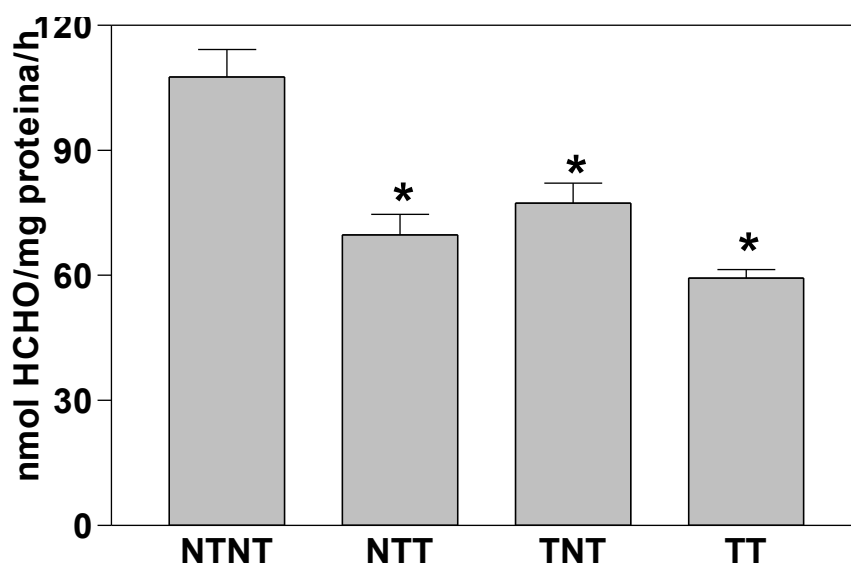
Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

\* $P < 0.001$  of NTNT (Tuckey-Kramer).

Na figura 5 observa-se que os níveis do formaldeído (HCHO) diminuíram de forma estatisticamente significativa, nos grupos não treinado tratado, treinado não tratado e, tratado treinado em relação ao grupo controle não treinado e não treinado.

## 5.2 Aminopirina N-demetilase

**Figura 6:** Efeito do decanoato de nandrolona e exercício físico sobre a atividade da enzima Aminopirina N-demetilase em fígado de ratos não treinados ou treinados e nos que receberam decanoato de nandrolona ou veículo, avaliado pela quantidade de formaldeído (HCHO) produzido pela reação de metabolização do substrato.



Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

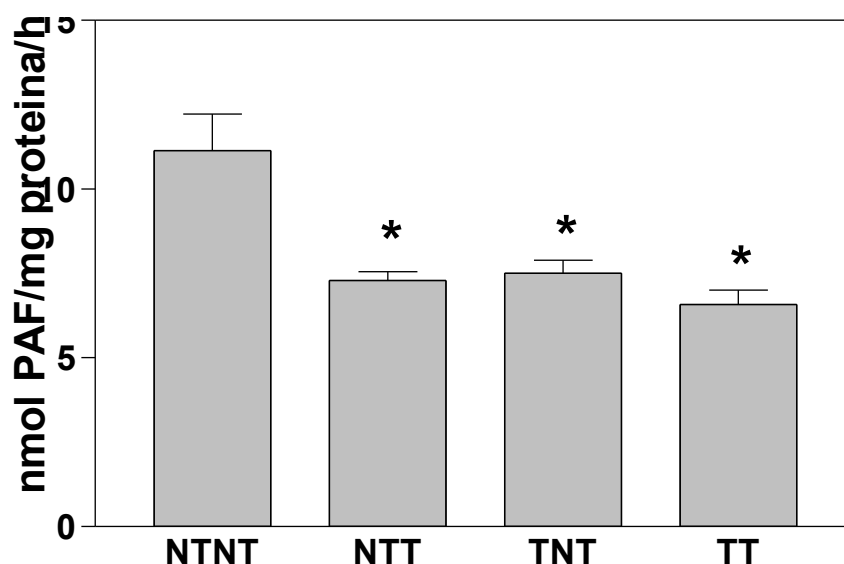
\* $P < 0.001$  -  $P < 0.01$  of NTNT (Tuckey-Kramer).

Na figura 6 observa-se que os níveis do formaldeído (HCHO) diminuíram de forma estatisticamente significativa, nos grupos não treinado tratado, treinado não tratado e treinado e tratado em relação ao grupo não treinado e não tratado.



### 5.3 Enzima Anilina Hidroxilase

**Figura 7:** Efeito do decanoato de nandrolona e exercício físico sobre a atividade da enzima Anilina Hidroxilase em fígado de ratos não treinados ou treinados e nos que receberam decanoato de nandrolona ou veículo, avaliado pela quantidade de paraminofenol (PAF) produzido na reação de metabolização do substrato.



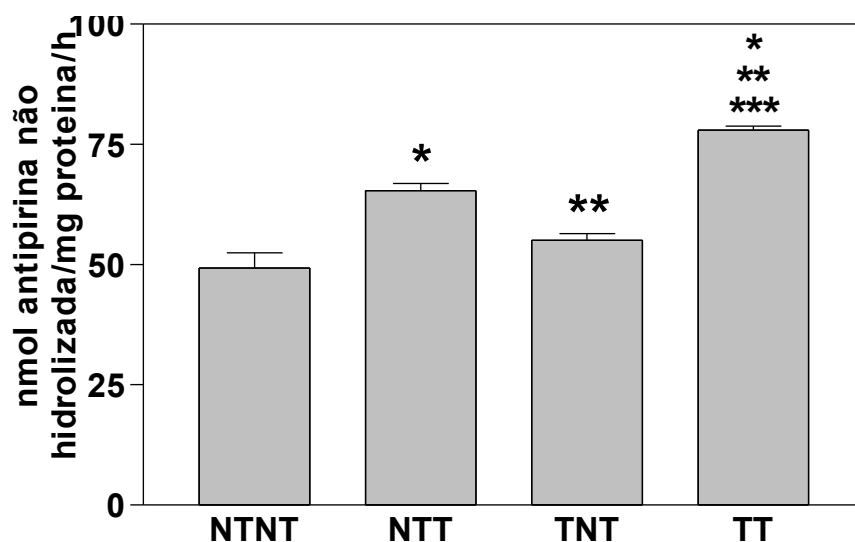
Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT = não treinado e não tratado; NTT= não treinado e tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

\* $P < 0.001$  -  $P < 0.01$  of NTNT (Tuckey-Kramer).

Na figura 7 observa-se que os níveis do paraminofenol (PAF) diminuíram de forma estatisticamente significante nos grupos não treinado tratado, treinado não tratado, e treinado e tratado em relação ao grupo não treinado e não tratado.

## 5.4 Enzima Antipirina Hidroxilase

**Figura 8:** Efeito do decanoato de nandrolona e exercício físico sobre a atividade da enzima Antipirina Hidroxilase em fígado de ratos não treinados ou treinados e nos que receberam decanoato de nandrolona ou veículo, avaliado pela quantidade de substrato (antipirina) não metabolizado.



Valores são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7 animais/grupo. NTNT= não treinado não tratado; NTT= não treinado tratado; TNT= treinado não tratado; TT= treinado e tratado.

\* $P < 0.001$  of NTNT \*\* $P < 0.001 - P < 0.01$  of NTT \*\*\* $P < 0.001$  of TNT (Tukey-Kramer).

Na figura 8 observa-se que: os níveis do substrato antipirina foram maiores, de forma estatisticamente significativa, nos grupos não treinado tratado e treinado e tratado, em relação ao grupo não treinado não tratado; o nível de antipirina no grupo treinado não tratado sofreu uma diminuição, estatisticamente significativa, em relação ao grupo não treinado tratado; o grupo treinado e tratado sofreu um aumento, estatisticamente significativo, em relação ao

grupo não treinado tratado; o nível de antipirina no grupo treinado e tratado foi maior, de forma estatisticamente significativa, em relação ao grupo treinado não tratado.

## *Discussão*



De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, administração prolongada de decanoato de nandrolona em ratos diminui a atividade enzimática hepática metabolizadora de drogas.

No presente experimento observa-se uma diminuição no ganho de peso tanto nos animais treinado quanto nos tratados. Como de certa forma o exercício físico é forçado e os animais treinados sofrem certo grau de estresse, variações em parâmetros como aumento de queima de gordura corporal levando a uma menor estocagem e mudanças de hábitos alimentares podem ter contribuído para os efeitos observados sobre o ganho de peso corporal.

Os resultados diferem daqueles encontrados por Georgieva (2004) que não obteve diferenças significativas no ganho de peso utilizando um protocolo semelhante de exercício e de administração do decanoato de nandrolona, porém, são semelhantes aos de Coyle (1997) e Cunha et al.(2005) que demonstraram com o exercício forçado que as reservas de glicogênio são mobilizadas rapidamente nos primeiros minutos de atividade e na seqüência, ocorre uma redução no uso de glicogênio com concomitante aumento do uso de gorduras, sugerindo que o exercício físico leva ao aumento do metabolismo aeróbico nos animais, reduzindo seu ganho de peso.

No presente estudo não foi encontrado diferenças no peso relativo do fígado entre os grupos experimentais. Na literatura alguns autores descrevem uma relação entre o desenvolvimento de tumores benignos e malignos no fígado com a utilização de EAA (WATANABE & KOBAYASHI, 1993; SOE et al., 1994; FRIEDL, 2000; VELAZQUEZ & ALTER, 2004), o que poderia provocar um peso aumentado. Talvez um período maior de tratamento pudesse acarretar alterações no peso do fígado.

Em relação ao peso relativo do coração não foram observadas diferenças significativas. Urhausen et al. (2004) em estudo envolvendo humanos relacionaram o uso de anabolizante com alterações no músculo do miocárdio caracterizadas por hipertrofia do ventrículo esquerdo. Liu et al. (2003) também relatam hipertrofia em humanos e ratos. Além disso, trabalhos na literatura têm relacionado o abuso de EAA por atletas jovens, do sexo masculino com diversos efeitos cardiovasculares adversos (FALKENBERG et al., 1997; FERRERA et al., 1997; DI BELO, 1999; McCARTHY, 2000).

Observou-se aumento significativo nos pesos do rim D e E dos grupos tratados (NTT e TT), sem alterações no peso da glândula adrenal. Não existe uma explicação plausível para esta observação, porém, como o decanoato produz retenção de água no organismo dos animais, talvez o aumento de peso dos rins esteja relacionado com uma sobrecarga hídrica.

No presente estudo não foram encontradas diferenças no peso dos testículos dos animais dos grupos experimentais. Maravelias et al. (2005) e Noorafshan et al. (2005) encontraram redução no peso dos testículos em função do tratamento com anabolizante esteróide em altas doses e por um tempo maior. Sugeriram que isto ocorreu devido a uma retro-alimentação negativa, ao menos parcial, no hipotálamo e na hipófise dos animais submetidos a este tratamento. Talvez a dose e o período de tratamento tenham sido os determinantes desta diferença.

Diferentemente de Karbalay-Doust et al. (2006) que encontraram atrofia da próstata (em média 39%), em ratos tratados por 14 semanas com decanoato de nandrolona, no presente experimento o peso desta glândula não variou entre os diferentes grupos experimentais. Aqui também, talvez o período de tratamento tenha feito à diferença.

Os experimentos mostraram um aumento nos pesos do ducto deferente e na vesícula seminal, com e sem secreção dos animais tratados com o Decanoato. Pode ser que níveis aumentados de androgênios e seus derivados tenham estimulando o ducto deferente e aumentado a secreção da vesícula seminal.

As enzimas AST, ALT, ALP e gama-GT são denominadas enzimas hepáticas e apesar de não serem organo-específicas, elevam-se mais freqüentemente no sangue de pacientes com doença hepática, podendo refletir algum dano ao fígado (PRATT et al. 1999; SHERLOCK et al. 2002). No presente estudo não foi observado nenhuma alteração nos níveis das enzimas hepáticas em nenhum dos grupos de tratamento, apesar de Maravelias et al. (2005) relatarem que elevações nos níveis das enzimas hepáticas são comuns em atletas que utilizam esteróides e Hough (1990) relatar que estas enzimas hepáticas podem até estar aumentadas em atletas que não utilizam anabolizantes.

Muitos trabalhos têm demonstrado experimentalmente a inibição e/ou estimulação da atividade enzimática metabolizadora de drogas pelo fígado de animais expostos a agentes químicos, de forma aguda e prolongada. Vários substratos são utilizados para a avaliação da atividade enzimática, citocromo P450 dependente. Neste trabalho estudou-se a atividade de N-demetilação, utilizando-se como substratos aminopirina e cafeína, e de hidroxilação, utilizando-se como substratos antipirina e anilina.

Os resultados obtidos nos experimentos mostram, de modo geral, que administração de Decanoato de Nandrolona em ratos durante seis semanas, promove inibição de atividade enzimática de N-demetilação e hidroxilação, no fígado dos animais.

A atividade enzimática hepática sobre drogas é influenciada por hormônios e perturbação hormonal tem sido aventada como um dos mecanismos de diminuição da atividade enzimática hepática sobre diversos substratos (McCLURE & STUPANS 1994). O decanoato ou algum seu metabólito poderia ocupar um sítio de ligação do citocromo P450, limitando o acesso de outros substratos ao sítio ativo da enzima. Este poderia ser um dos mecanismos pelos quais o decanoato de nandrolona poderia reduzir a capacidade metabólica hepática sobre os substratos utilizados nos nossos experimentos. Reforçando esta sugestão, Lund et al. (1991) referem que a expressão e a atividade catalítica de muitas enzimas hepáticas citocromo P450 de mamíferos que possuem um papel central na biosíntese e metabolismo de muitos constituintes endógenos são regulados por andrógenos e estrógenos.

Além disso, o glicogênio hepático está implicado na geração e fornecimento de equivalentes redutores, na forma de NADPH, para a reação das enzimas de metabolização (DALLNER et al., 1966, THURMAN & KAUFMAN, 1980). Como tem sido sugerido que estereóides androgênicos podem modificar a disponibilidade de glicogênio no fígado (CUNHA et al. 2005), esta poderia ser também mais uma forma de atuação danosa do decanoato para provocar os efeitos de inibição enzimática observados.

Considerações a respeito da interferência de substâncias químicas sobre a atividade de metabolização de endobióticos e principalmente xenobióticos pelo fígado são particularmente importantes por causa da importância deste órgão na inativação e detoxificação de compostos tóxicos como drogas, carcinogênicos e poluentes ambientais. Apesar de existirem trabalhos citando hepatotoxicidade por anabolizantes (MARAVELIAS et al., 2005), não foram encontrados trabalhos na literatura corrente, relacionando especificamente o uso de decanoato de nandrolona com diminuição da atividade metabólica hepática sobre drogas.



Nos animais que fizeram apenas o exercício físico forçado, observou-se inibição da atividade de N-demetilação da cafeína e da aminopirina e inibição da atividade de hidroxilação apenas da anilina, sendo que a hidroxilação da antipirina não foi alterada.

Há alguns pouquíssimos trabalhos na literatura mostrando possíveis alterações da atividade metabólica sobre substratos por causa do exercício físico e os resultados não são consistentes. Por exemplo, enquanto que dados de Day & Weiner (1991) sugerem inibição da atividade metabólica pelo exercício, os dados de Moochhala et al. (2002) sugerem aumento desta atividade. Já Maiti et al. (2004), observaram que o estresse físico ou o químico induz as enzimas sulfotransferases (enzimas de fase II) no fígado, via modulação hormonal. Frenkl et al. (1980) encontram diminuição da atividade da enzima aniline hidroxilase pelo exercício, em ratos; este resultado confirma nossas observações com o metabolismo da anilina nos animais submetidos ao exercício forçado.

No presente trabalho não foi avaliada a quantidade de estresse oxidativo no fígado dos animais submetidos ao exercício físico forçado, mas é sabido que estresse oxidativo é capaz de inibir a atividade enzimática hepática sobre drogas. A atividade muscular aumentada durante o exercício físico, ocasiona a diminuição da atividade dos sistemas de enzimas diretamente responsáveis pelo tamponamento de radicais livres, no fígado (PYKE et al., 1986). Neste sentido, Watkins 3rd et al. (1994), observaram que ratos submetidos experimentalmente ao exercício forçado tiveram uma elevação significativa do *clearance* hepatobiliar de GSH e GSSG, indicando uma possível alteração na homeostase celular de tiol. O aumento de espécies reativas de oxigênio que ocorre nesta situação pode provocar peroxidação lipídica e diminuir a atividade de enzimas citocromo P450 dependentes (WISERMAN, 2004; CHAVES, et al., 2006; SATO et al., 2006). Esta poderia ser uma

explicação para os resultados obtidos com os animais submetidos ao exercício forçado, levando à diminuição da atividade enzimática metabolizadora de drogas.

Com relação à influência do exercício físico nos níveis do citocromo P450 microsomal hepático, existe ainda contradição. Enquanto Michaud et al. (1994) não encontraram alteração, Kim et al.(2002) encontraram aumento de quantidade. O fato dos tratamentos não ter modificado a quantidade de proteína microsomal, no presente experimento, pode sugerir que nenhuma alteração dos níveis de citocromo tenha ocorrido, apesar de que a dosagem não foi específica para a hemoproteína citocromo P450.

Quando os animais receberam o decanoato e fizeram o exercício forçado, a inibição da atividade de demetilação da cafeína e da aminopirina e de hidroxilação da anilina, se mantiveram nos mesmos níveis praticamente. Porém, a atividade de hidroxilação da antipirina que não havia sido mudada pelo exercício físico somente, agora foi muito maior indicando que o exercício parece ter potenciado este efeito inibidor enzimático do decanoato. Este efeito contribui para reforçar a sugestão da implicação do estresse oxidativo no efeito inibidor enzimático hepático do decanoato.

# *Conclusões*



O conjunto dos resultados obtidos no presente experimento fornece subsídios para concluir que:

- Decanoato de nandrolona inibiu a atividade enzimática hepática da aminopirina *N*-demetilase, cafeína *N*-demetilase, antipirina hidroxilase e anilina hidroxilase nos animais;

- O exercício físico inibiu a atividade enzimática hepática metabolizadora de drogas nos animais;

- O exercício físico potenciou o efeito diminuidor do decanoato de nandrolona sobre a atividade da enzima antipirina hidroxilase;

- O estresse oxidativo pode estar envolvido no efeito tóxico do decanoato de nandrolona sobre a atividade enzimática hepática microsomal.

- Os efeitos danosos do decanoato de nandrolona e do exercício físico forçado sobre o fígado não parecem ser devido a alterações da integridade da célula hepática.

- Estudos envolvendo experimentos com outros substratos enzimáticos para comprovar o envolvimento de outros CYPs, nos efeitos tóxicos sobre o fígado, pelo decanoato, devem ser realizados.

# *Referências Bibliográficas*



AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position statement on the use and abuse of anabolic-androgenic steroids in sports. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.19, p.534-9, 1987.

ANNITTO, W.J.; LAYMAN, W.A. Anabolic steroids and acute schizophrenic episode. **J. Clin. Psych.**, v.41, p.143-144,1980.

BLANCHARD, N., et al. Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.23, p.189-99, 2004.

BENET, L.Z.; KROETZ, D.L.; SHEINER, L.B. Farmacocinética: a dinâmica de absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GUILMAN, A.G. (Eds.) Goodman & Gilman, **As bases farmacológicas da terapêutica**, Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, p.3-20, 1996.

BENNETT, P.N.; BROWN, S.M.J. **Clinical Pharmacology**. 9<sup>a</sup> th edition, Elsevier. p.804, 2003

BRODIE, B.B.; AXELROD, J. The fate of antipyrine in man. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.98, p.97-104, 1950.

BROWER, K.J. Anabolic steroids. **Psych. Clin. North Am.**, v.16, p.97-103, 1993.

BUCKLEY, W.A et al. Estimated prevalence of anabolic steroid use among male high school seniors. **JAMA**, v. 260, p.3441-5, 1988.

BUTLER, M.A., et al. Human cytochrome p-450PA (P-4501A2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.86, p.7696-7700, 1989.

CATLIN, D.H.; MURRAY, T.H. Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic Sport. **JAMA**, v.276, p.231-7, 1996.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **Eur. J. of Clin. Investig.**, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

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

Council on Scientific Affairs. Drug abuse in athletes: anabolic steroids and human growth hormone. **JAMA**, v.259, p.1703-5, 1988.

COYLY, E.F. Metabolismo lipídico durante o exercício. **Sports Sci. Exch.**, v.15, p. 20-6, 1997.

CHAVES, E.L., et al. Nandrolone decanoate impairs exerciseinduced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.99, p.223-30, 2006.

- CHUNG, W.G., et al. Involvement of CYP3A1, 2B1, and 2E1 in C-8 hydroxylation and CYP 1A2 and flavin-containing monooxygenase in N-demethylation of caffeine: identified by using inducer treated rat liver microsomes that are characterized with testosterone metabolic patterns. **Chem. Biol. Interac.**, v.113, p.1-14,1998.
- CUNHA, T.S., et al. Relation between anabolic androgenic steroid administration, aerobic physical training and glycogen supercompensation. **Rev. Bras. Med. Esp.** v.1, n.3, p.180E-184E, 2005.
- DALBY, J.T. Brief anabolic steroid use and sustained behavioral reaction. **Am. J. Psych**, v.149, p.271-2, 1992.
- DALLNER G.; SIEKEVITZ, P.; PALADE, G.E. Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes: structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte. **J. Cell. Biol.**, v.30, p.73-117, 1966.
- DAY, W.W; WEINER. Inhibition of hepatic drug metabolian and CCl4 toxicity in fischer-344 rats by exercise. **Biochem. Pharmacol.** v.42, n.1, p.181-184, 1991.
- DE ROSE, E.H.; NÓBREGA, A.C.L. Drogas lícitas e ilícitas. In: Ghorayeb, N.; Barros, T.O. **Exercício**. São Paulo: Atheneu, 1999; 395-405.
- DELAFORGE, M. Importance of metabolism in Pharmacological Studies: Possible in vitro Predictability. **Nucl. Med Biol.**, v.25, p. 705-09, 1998.
- DI BELO, V., et al. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.31, p.514-21, 1999.



DOUIDAR, S.M.; SHAVER, C.S.; SNODGRASS, W.R. Hepatotoxicity from hazardous chemicals. In: SULLIVAN, J.B.; KRIEGES, G.R. (Eds.) **Hazardous materials toxicology: clinical principles of environmental health**. Baltimore: William & Wilkins, 1992.

DURANT, R.H., et al. Use of multiple drugs among adolescents who use anabolic steroids. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 922-6, 1993.

FAHEY, T.D. Anabolic-androgenic steroids: mechanism of action and effects on performance. In: Fahey TD, editor. **Encyclopedia of sports medicine and science**. Internet Society for Sport Science, 1998. Available form: <<http://www.sportsci.org>>  
Acesso em: 20 jun. 2006

FALKENBERG, M.; KARLSSON, J.; ORTENWALL, P. Peripheral arterial thrombosis in two young men using anabolic steroids. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v.13, p.223-6, 1997.

FERRERA, P.C, PUTNAM, D.L, VERDILE, V.P. Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 88, p.218-20, 1997.

FRENKL R.; GYÖRE, Ä.; SZEBERÉNYI, S.Z. The effect of muscular exercise on the microsomal enzyme system of the rat liver. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v.44 (2), p.135-140, 1980.

FRIEDLL, K.E. Effect of anabolic steroids on physical health. In: YESALIS, C.E. (Ed). **Anabolic Steroids in Sports and Exercise**, Champaign, 2000.p.175-225.

GHAPHERY, N.A. Performance-enhancing drugs. **Orthop. Clin. Noorth. Am.**,v.26, p.433-42, 1995.

GEORGIEVA, K.N; BOYADJIEV, N.P. Effects of Nandrolone Decanoate on  $VO_{2max}$ , Running Economy, and Endurance in Rats. **Med. Scienc. Sports Exerc.**, v.36, n.8, p.1336-1341, 2004.

HALLWELL, B., AND CHIRICO, S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and signfiicance. **Am. J. Clin Nutr**, v.57, p. 715, 1993.

HALLWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C,: **Free Radicals in Biology and Medicine**. MCARDLE, W. (Ed.). Oxford, Claredon Press, 1989.

HARDMAN, J.G.; GILMANN, A.G.; LINBIRD, L.E., EDITORS. Godman and Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**, New York: McGraw-Hill, 1996.

HAUPT, H.A.; ROVERE, G.D. Anabolic steroids: a review of the literature. **Am. J. Spots Med.**, v.12, n.6, p.469-84, 1984.

HOUGH, D.O. Anabolic steroid and ergogenic aids. **Am. Fam. Phys**, v.41, p. 1157-1164, 1990.

KARBALAY-DOUUST, S.; NOORAFSHAN A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. **Micron**, v.37, p. 617-23, 2006.

KATO, R.; GILLETTE, J.R. Effects of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomas of male and female rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.150, p.279-84, 1965.

KIBBLE, M.W., ROSS, B.M. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. **Clin. Pharm.**, v.6, p.686-92, 1987.

KIM, H.J., et al. Influence of 4-week and 8-week exercise training on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azosemide in rats. **Life Sci**, v.70, p. 2299-2319, 2002.

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

LIU, P.Y; DEATH, A.K; HANDELSMAN, D.J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocr. Rev.**, v.24, p. 313-40, 2003.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p.265, 1951.

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

LUND, J., et al. Hormonal regulation of P-450 gene expression. **Adv. Pharmacol.**, v.22, p. 325-54, 1991.

MAITI, S., et al. Stress regulation of sulfotransferases in male rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.323, p.235-241, 2004.

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

MAZEL, P. Experiments illustrating drug metabolism in vitro. In: *Fundamentals of Drug Disposition*, ed. La Du, B.N., Mandel, H.G., WAY, E.L. Baltimore:Williams and Wilkins, pp.546-82.

McCARTHY, K., et al. Ventricular thrombosis and systemic embolism in bodybuilders: etiology and management. **Ann. Thorac. Surg.**, v.70, p.658-60, 2000.

McCLURE, M.T. and STUPANS, I. Hormonal perturbation as a possible mechanism for the alteration of cytochrome P450 by cyclophosphamide. **Biochem. Pharmacol.** v.49, n.12, p.1827-1836, 1995.

MELTZER, N.M.; STANG, P.; STERNSON, L.A. Influence of tamoxifen and its N-desmethyl and 4-hydroxy metabolites on rat liver microsomal enzymes. **Biochem. Pharmacol.**, v.33, p.115-23, 1984.

MICHAUD, T.J., et al. Exercise training does not alter cytochrome P-450 content and microsomal metabolism. **Med. Scienc. Sports Exerc.** v. 26(8), p. 978-82, 199.

MOOCHHALA, S.M.; FUNG, K.P.; YUEN, R.; DAS, N.P. Effects of acute physical exercise on aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human peripheral lymphocytes. **Life Sciences**, v.47, n.5, p.427-432.

NOORAFSHAN, A.; KARBALAY-DOUT, S.; ARDEKANI, F.M. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. **APMIS**, v.113 (2), p.122-25, 2005.

OKITA, R.T.; MASTERS, B.S.S. Biotransformações: Os Citocromos P450. In: DELVIN, T.M. (Ed). **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Ed. Edgard Blucher, 2002. p. 819-833.

POPE Jr., H.G.; KATZ, D.L. Bodybuilders' psychosis. **Lancet**, v.1, p.863, 1987.

POPE Jr., H.G.; KATZ, D.L. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use – A controlled study of 160 athletes. **Arch. Gen. Psych.**, v.51, p.375, 82, 1994.

POPE Jr., H.G.; KATZ, D.L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psychiatry**, v.145, p.487-90, 1988.

PRATT, D.S.; KAPLAN, M.M. Laboratory tests. In: SCHIFF, E.R; SORELL, M.F; MADDREY, W.C (Eds). **Diseases of the liver**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 205-244.

PYKE, S.; LEW, H.; QUINTANILHA, A. Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 139, n.3, p.926-931.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692 p.

RAUCY, J.L. Risk assessment: toxicity from chemical exposure resulting from enhanced expression of CYP2E1. **Toxicology**, v. 105, p.217-223, 1995.

REENTS, S. Sport and exercise pharmacology. **Champaign: Human Kinetics, 2000. 344 p.**

RIBEIRO, P.C.P. O uso indevido de substâncias esteróides anabolizantes e energéticos. **Adolesc. Latinoam.**, v.2, p.97, 2001.

SATO, T.; YAMAMOTO, H.; SAWADA, N. et al. Restraint stress alters the duodenal expression of genes important for lipid metabolism in rat. **Toxicology**, v.227, p.248-261, 2006.

SCHUMACHER, J.; MULLER, G.; KLOTZ, K. Large hepatic hematoma and intra-abdominal hemorrhage associated with abuse of anabolic steroids. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.1123-4, 1999.

SHAHIDI, N.T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clin. Ther.**, v.23, p.1355-90, 2001.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. Seventh Edition. Iowa: Iowa State University Press,. 1980.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. Avaliação da função hepática. In: SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. (Eds). **Doença do fígado e do sistema biliar**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.17-31.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIPES, J.G.; GANDOLFI, A.J. Biotransformation of toxicants. In: KLAASSEN, C.D.; ADMUR, M.O.; DOULL, J., (Eds.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 3.ed. New York: Mcmillan, p.64, 1986.

SNYDER, P.J. Androgens. In: HARDMAN LIMBIRD, J.G.L.E., Goodman & Gilman, A. (Eds), **The pharmacological Basis of Therapeutics**, tenth ed. New York: McGraw Hill, 2001, p. 1635-1648

SOE, K.L.; SOE, M.; GLUUD, C.N. Liver pathology associated with anabolic-androgenic steroids. **Ugeskr Laeger**, v.156, p.2585-2588, 1994.

STRAUSS, R.H.; LIGGETT, M.T.; LANESE, R.R. Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes. **JAMA**, v.253, p.2871-3, 1985.

STURNI, J.E; DIORIO, D.J. Anabolic Agents. **Clin. Sports Med.**, v.17, p. 261-82, 1998.

SU, T.P., et al. Neuropsychiatric effects of anabolic steroids. **JAMA**, v.269, p. 2760-4, 1993.

TAMAKI, T., et al. Anabolic steroids increased exercise tolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metabol**, v.280, p.973-81, 2001.

TENNANT, F.; BLACK, D.L.; VOY, R.O. Anabolic steroid dependence with opioid-type features. **N. Engl. J. Med.**, v.319, p.578, 1988.

THURMAN, R.G.; KAUFFMAN, F.C. Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. **Pharmacol. Rev.**, V.31, P.229-251, 1980.

TUCKER, R. Abuse of anabolic-androgenic steroids by athletes and body builders: A review. **Pharm.J.**, v.259, p. 175-180, 1997

URHAUSEN, A.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart**, v.90, p.496-501,2004.

VELAZQUEZ, I.; ALTER, B.P. Androgens and liver tumors: Fanconi's conditions. **Am.J.Hematol**, v.77, p.257-67, 2004.

VOGEL, W.; KLAIBER, E.L.; BRAVERMAN, D.M. A comparison of the antidepressant effect of a synthetic androgen (mesterolone) and amitriptyline in depressed men. **J. Clin. Psych.**, v.46, p.6-8, 1985.

WATANABE, S.; KOBAYASHI, Y. Exogenous hormones and human cancer. **J.Clin.Oncol**, v.23, p.1-13, 1993.



WATIKNS 3rd, J.B; CRAWFORD, S.T; SANDERS, R.A. Chronic voluntary exercise may alter hepatobiliary clearance of endogenous and exogenous chemicals in rats. **Drug Metab. Dispos.**, v.22 (4), p.537-543, 1994.

WEI, X.; LOI, C.; SCHUMUCKER, D.L.; VESTAL, R.E. Characterization of the independent and combined effects of two inhibitors on oxidative drug metabolism in rat liver microsomas. **Biochem. Pharmacol.**, v.49, p.1657-63, 1995.

WILSON, J.D. GOODMAN & GILMAN - As Bases farmacológicas da terapêutica. In: MOLINOFF, P.B ; RUDDON, M.D. (Eds.). **Androgênios**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1068-1081, 1996.

WILSON, J.D. Androgen abuse by athletes. **Endocr. Rev.**, v.9 (2), p.181-99, 1988.

WISERMAN, A. Elimination of major sides effects due to ROS of therapeutical through biotransformation control of the 57 cytochromes P450 isoenzymes. **Med. Hypoth.** v.64, p.802-805, 2005.

YESALIS, C.E. Epidemiology and patterns of anabolic-androgenic steroid use. **Psychiatr. Ann.**, v. 22, p. 7-18, 1992.

# *Artigo Científico*



**Title**

NANDROLONE DECANOATE ADMINISTRATION AND PHYSICAL EXERCISE  
INHIBIT HEPATIC DRUG METABOLIZING ACTIVITY IN RATS.

**Authors**

Jaqueline A.G. Marino<sup>1</sup>, Oduvaldo C. M. Pereira<sup>2</sup>, Antonio F. Godinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Toxicological Assistance Center (CEATOX), Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Institute of Bioscience, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

\*Corresponding author. Telephone/Fax +55 14 3815 3048

E-mail address: [godinho@ibb.unesp.br](mailto:godinho@ibb.unesp.br)

## **Abstract**

In the present study was determined the effect of prolonged administration of a commonly used androgenic-anabolic steroids (AAS), nandrolona decanoate (ND), on hepatic drug metabolism performance in non-trained and exercised-trained (EX) rats. Male, adult Wistar rats were divided in four experimental groups (N=7), respectively: non-trained not treated (NTNT), non-trained treated (NTT), trained not treated (TNT), trained and treated (TT). ND was administered 5mg/kg, intramuscularly, six weeks, two-time a week. Physical exercise consisted of running, 20-40 min sessions, 3-4 days/week, for six weeks. During treatments period weekly body weight gain was recorded. After the final of the experimental protocol blood was collected for serum enzymes determinations and liver for in vitro, enzymatic drug metabolism assay. Both, ND and EX alone or together reduced the body weight gain and the activity of microsomal aminopyrine N-demethylase, caffeine demethylase, aniline hydroxylase and antipyrine hydroxylase enzymes. The observed toxic effect on body weight gain and liver enzymatic activity were observed without none alterations on liver weight, microsomal protein level or serum alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transaminase (AST), and gamma glutamic acid transferase (GGT) enzyme levels, suggesting none structural damage on microsomal Cytochrome P450 (CYP) system. The possibility of a AAS direct effect on liver microsomal CYP enzymes or a indirect effect through oxidative stress and decreased NADPH generation for molecular mechanisms involved in the observed toxic effects, were discussed.

## *Keywords*

Nandrolone decanoate, liver metabolism, physical exercise, enzymes, aminopyrine N-demethylase, caffeine N-demethylase, aniline hydroxylase, antipyrine hydroxylase, oxidative stress, rat.

## **Introduction**

Androgenic-anabolic steroids are a class of synthetic derivatives of testosterone modified to enhance anabolic (myotrophic) rather than androgenic (masculinizing) actions of the original hormone [1]. Despite AAS are synthesized for use in modern medicine for therapeutic reasons athletes and young have been reported as abusing AAS at supraphysiological doses to improve physical performance and aesthetic benefits acquisition, through a purported effect on muscle mass and strength [2,3,4]. However, as almost of totality of organism tissues to possess androgenic hormone receptors, numberless reversible or irreversible effects that include reproductive [5,6], hepatic [7], endocrine[8,9], and cardiovascular functions [10,11,12], as well on musculoskeletal features [13] and subjective alterations of behavior [14,15] occur by prolonged AAS use.

More frequent observed liver dysfunctions include cholestatic liver injury [16], elevations in levels of liver enzymes aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and lactate dehydrogenase [15], both benign and malignant tumors [7], and peliosis hepatitis [17]. Despite the limited information of AAS on hepatic performance, lack reports of influence on hepatic drug metabolism system in animal or humans studies.

The human use of AAS in general occurs concomitantly with physical exercise because this exalt the purported AAS effect on muscle mass and strength [1]. Physical exercise markedly increases oxygen uptake particularly in skeletal muscle and increased oxygen consumption further increases the leaking of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>), and singlet oxygen, as products of oxidative phosphorylation, from the mitochondrial electron transport chain [18]. The imbalance, in favor of the free radicals, between the increased ROS generation and the scavenging capacity is termed oxidative stress [18].

Physical or chemical stress as an exogenous or endogenous source may significantly interfere with physiologic metabolic process by changing neuroendocrine regulation, hormone regulation, and/or by increasing oxidative stress through alteration of intracellular redox status. There are few relates of the

effects of physical exercise on liver function. Lew et al. [19] observed that oxidative stress induced either by physical exercise or drug (acetaminophen) detoxification, by depleting body (liver) stores of glutathione, affected the ability of cells to protect themselves against oxidant injury. Pyke et al. [20], demonstrated that physical exercise at submaximal levels in rats resulted in progressive depletion of liver glutathione to about 20% of the levels found in sedentary controls, which persists for several hours following the cessation of exercise. Thus, hepatic drug metabolism can be influenced by exercise because it can induce alterations in Cytochrome P450 contents and function. Changes in activities of various enzymes after exercise have been also reported. For example, changes in p-nitroanisole O-demethylase, uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyl transferase, morphine UDP-glucuronosyl transferase, glutathione S-transferase (GST), N-acetyltransferase and aniline hydroxylase activities have been reported [21,22,23,24]. However, effects of exercise on the pharmacokinetic and/or pharmacodynamic changes of drugs seem to depend on the strength, duration and time of exercise, gender and drugs [25,26].

CYPs are enzymes often catalyze the initial steps in both activation and detoxification of xenobiotics and comprise a superfamily of multifunctional forms encoded by distinct genes [27]. These enzymes are located on the smooth endoplasmic reticulum [27,28] and provide many vital functions, including the oxidative metabolism of steroids, fatty acids, prostaglandins, biogenic amines, and the metabolism of xenobiotic compounds. The greater importance of the liver drug metabolizing system is that exposure of individuals to a variety of chemicals at one time is becoming increasingly more apparent and may result in serious toxicological consequences when one chemical modulates the metabolism of another. Therefore, in order to clearly evaluate the risk for toxicity, the extent and complexity of the chemical exposure must be considered.

The existence of many P450 enzymes with differing substrate selectivity and modes of regulatory control underlies the observed variability in the relative rates of substrate metabolism to both toxic and nontoxic products. The expression and hence catalytic activities of many mammalian hepatic P450 enzymes that play central roles in the biosynthesis and metabolism of many important endogenous constituents are regulated by androgens and estrogens [29]. In this view Mugford and Keddris [30]

related that in mammals, the activities of P450 enzymes evolved in xenobiotic biotransformation tend to be higher in male animals than in females.

The aim of the present study was therefore to determine the effect of prolonged administration of a commonly used AAS, nandrolone decanoate, on hepatic drug metabolism performance in non-trained and exercised-trained rats.

## **Materials and methods**

*Materials.* Nandrolone Decanoate is purchased from Organon Ltd. (Sao Paulo, Brazil). Aminopyrine, aniline, antipyrine, NADP, bovine serum albumin, glucose-6-phosphate, and nicotinamide, were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, Missouri). Semicarbazide were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA). Caffeine was purchased from Acros Co. (New Jersey, USA). All other chemicals were purchased of the highest grade commercially available.

*Animals and drug treatment.* Adult male Wistar rats (75 days old, from our institutional colony) were used in this investigation. Rats were housed in a temperature-controlled ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) room with a inverted 12 h light/12 h dark cycle and supplied with standard chow and water ad libitum. For treatments four experimental groups (N=7) were designed as non-trained not treated, non-trained treated, trained not treated, and trained and treated. Nandrolone decanoate was administered intramuscularly, 5mg/kg, two times a week, during six weeks (to part from third week of the running protocol). This dose has been commended as equivalent to those utilized for athletes, 600 mg/week or approximately 8 mg/kg/week, in academy [31]. One time a week animals were weighted to obtain the body weight gain. The mean of values obtained during the six week of treatment period was expressed as weight gain percentage.

*Running protocol.* Rats in the TNT and TT groups were forced to exercise by running on an adapted 5-lane treadmill. A program of exercise training was adapted from previously described methods [32]. Rats were submitted to exercise 3-4 days/week, for 8 weeks. In the first and second week, rats were familiarized to motor-driven treadmill (3 days/week) at a speed of 5m/min. The angle of inclination was 0% gradient and the running time was 5 min/day. To part from third week the speed

was fixed in 27m/min and the angle inclination in 5°. Running time was increased to 20 - 30 min in the third week reaching 40 min in the second day of the fourth week remaining so until the last week. Rats of NTNT and NTT groups were submitted to exercise (one day/week, speed of 27m/min, angle inclinations of 5°, and running time of 40 min) to simulate the stress of physical exercise. This condition corresponded to a moderate intensity of about of 70-75% of maximal oxygen consumption [32].

*Isolation of hepatic microsomal fractions.* Animals under diethyl ether anesthesia were decapitated using a guillotine-cutter, 24 h after the final of the experimental protocol. Blood samples was collected for spectrophotometrically assay of the serum ALT, AST, and GGT levels enzymes. The protocol utilized to isolation of hepatic microsomal fractions was in according to [33]. Brief, the excised liver was weighed and sliced, and samples were finely minced by using sharp scissors. After being minced, a 12,5% (w/v) crude homogenate was prepared (1 g of liver + 7 volumes of isotonic (1.15%) KCl-10 mM Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer, pH 7.4) by homogenizing the minced tissue in a Teflon pestle homogenizer and centrifuged at 10,000g for 10 min. To determine microsomal protein, the supernatant was collected (10.0 ml) and centrifuged at 105.000g for 60 min. The clear supernatant was separated and the microsomal precipitates resuspended with 10 volumes of 50 mM Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> phosphate buffer, pH 7.4. Each 1.0 ml of the microsomal suspension was equivalent to 125 mg of liver. All fractions were stored at -70°C until assayed. Microsomal protein content was determined [34] by using bovine serum albumin as standard.

*Incubation and analytical methods.* Mixture containing microsomal protein (10,000g supernatant fraction) and an NADPH-generating system (consisting of 0.65 µmol NADP, 10 µmol glucose-6-phosphate, 50 µmol nicotinamide, and 25 µmol magnesium chloride in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) containing semicarbazide\* (45 µmol/ 3 ml), were used for all incubations. All reactions were initiated by the addiction of the 5 µmol aminopyrine or 13 µmol caffeine or 5 µmol aniline or 5 µmol antipyrine to the NADPH-generating system and were conducted at 37°C. in an oscillating water bath. The rate of aminopyrine N-demethylation [33] and caffeine N-demethylation [35] were estimated by measuring formaldehyde formed by the method of Nash [36]. The rate of



aniline hydroxylation was estimated by measuring *p*-aminophenol formed [33]. The rate of antipyrine hydroxylation was estimated according to the rate of substrate non-hydrolyzed [37]. \*Semicarbazide was included when formaldehyde was to be determined.

*Statistical analysis.* The different data obtained were analyzed using InStat 3.0 (Graph Pad Software). Data were compared through one-way analyses of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer test was used for comparisons between means whenever the test for ANOVA was significant at  $P < 0.05$  [38].

## **Results**

### *Unchanged parameters*

Relative liver humid weight, level of microsomal proteins, and serum enzymes (AST, ALT, and GGT) were not significantly altered ( $P > 0.05$ ) in rats following NTT, TNT, and TT treatments (data not showed).

### *Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat weight gain*

The body weight gain decreased significantly in rats following NTT, TNT, and TT treatments, compared with the NTNT treatment group (Fig. 1). The pattern and fold of decrease were similar in NTT ( $P < 0.01$ ) and TNT ( $P < 0.05$ ) group but was higher in the TT group ( $P < 0.001$ ). The weight gain obtained in the TT group was significantly different ( $P < 0.05$ ) of the NTT group. The difference between TT and TNT group (27% lower) was not significant ( $P > 0.05$ ).

### *Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat microsomal enzyme demethylation activity*

Caffeine demethylase activity was decreased significantly in rats following NTT, TNT, and TT treatments, compared with the NTNT treatment group (Fig. 2). The pattern and fold of decrease was similar in NTT ( $P < 0.001$ ), TNT ( $P < 0.001$ ), and TT ( $P < 0.001$ ) groups. None difference ( $P > 0.05$ ) were observed in the enzymatic N-demethylation activity between NTT, TNT, and TT groups.

Aminopyrine *N*-demethylase activity was decreased significantly in rats following NTT, TNT, and TT treatments, compared with the NTNT treatment group (Fig. 3). The pattern and fold of decrease was similar in NTT ( $P<0.001$ ), TNT ( $P<0.01$ ), and TT ( $P<0.01$ ) groups. None difference ( $P>0.05$ ) were observed in the enzymatic *N*-demethylation activity between NTT, TNT, and TT groups.

*Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat microsomal enzyme hydroxylation activity*

The aniline hydroxylase activities in non-trained and trained rats receiving AAS are shown in Figure 4. The NTT, TNT, and TT treatments significantly depressed the liver microsomal aniline hydroxylase activity, compared with the NTNT treatment group. The pattern and fold of decrease was similar in NTT ( $P<0.01$ ), TNT ( $P<0.01$ ), and TT ( $P<0.001$ ) groups. None difference ( $P>0.05$ ) were observed in the enzymatic hydroxylation activity between NTT, TNT, and TT groups.

Figure 5 shows that the quantity of antipyrine not hydrolyzed were significantly higher in NTT and TT treatment groups compared with the NTNT ( $P<0.001$  and  $P<0.001$  respectively) and the TNT ( $P<0.01$  and  $P<0.001$  respectively) treatment groups indicating a decrease in the antipyrine hydroxylase activity. The fact of the physical exercise alone (TNT group) not modify ( $P>0.05$ ) the rate of liver microsomal antipyrine hydrolysis but physical exercise plus ND (TT group) presented a higher quantity of antipyrine not hydrolyzed when compared with NTNT ( $P<0.001$ ) and NTT ( $P<0.001$ ) treatment groups is suggestive of a raising to a power effect provoked by the physical exercise in the toxicity of ND on antipyrine hydroxylase enzyme activity.

## Discussion

The major finding of this study is that the nandrolone decanoate and physical exercise in rats, inhibit both rat liver hydroxylation and demethylation enzymatic activities.

It is known that regular EX can lead to changes in body composition, by increasing muscular mass and reducing body fat [1]. Analyzing the results obtained in the present study, with regard to body weight, it is observed that at the end of the experimental period, NTT, TNT, and TT animals presented lower weight gain than the respective NTNT group. These results conflict with that obtained by Gorgeva [32] which non observed difference in rat weight gain, utilizing an analogous protocol of physical exercise and AAS administration, but might be in agree with the observed by Coyly [39] and Cunha et al. [40] which demonstrated that during physical exercises, the glycogen reserves are used in the first min of activity and as the exercise proceeds, there is a reduction in glycogen consumption with concomitant increase in the use of fats.

Thus, it is believed that the physical training protocol led to increased aerobic metabolism in the treated and trained animals, reducing body weight gain. The fact of the TT animals presented a lower weight gain when compared with NTT ( $P<005$ ) and TNT, suggest an addictive effect by EX and ND applied concomitantly. AAS have been demonstrated to induce a number of metabolic changes in non-exercised male rats, including lack of appetite and, consequently, a reduced rate of body weight gain [41]. Abuse of AAS is sometimes associated with a form of “reverse anorexia”, which is characterized by a drive to increase lean body mass while reducing body fat [42].

Several functional tests are currently used to detect liver damage. Circulating enzymes and microsomal enzymes activity tests have been proposed as being more sensitive and specific for detecting the functional ability of the liver [43,44,45]. ALT, and AST to reflect changes in cellular permeability rather than cellular function and can be indicators of cellular necrosis although are not specific for the liver since are present in other tissues. GGT is a more sensitive indicator of liver injury and is specific to the liver. Serum enzyme levels represent loss of hepatocyte cellular integrity and are accurate indicators of acute hepatic disease but they do not represent the metabolic function on the liver [44]. In this work was observed none effect of AAS and EX on serum circulating liver enzymes.

This result suggests that treatments were unable to produce alterations on hepatocyte cellular integrity, despite Maravelias et al. [15] been related increased serum levels of hepatic enzymes in athletes using AAS.

Phase I and phase II drug metabolizing enzymes are responsible for detoxification of xenobiotics found in food, drugs, and environmental media. Hydroxylation and demethylation activity belong to the phase I drug metabolizing enzymes and are two important pathways in endogenous compounds regulation and in exogenous xenobiotic metabolism [46]. Despite regulation of drug metabolizing enzymes by different hormones and stressors has been studied, the regulation of drug metabolizing enzymes by nandrolone decanoate and physical exercise concomitantly has not been reported.

The present results showed a decreased rate of N-demethylation and hydroxylation activity presented by microsomal CYPs of AAS treated and trained animals. This suggest that both ND and EX can regulate hydroxylase and demethylase activities in male adult rat liver. Expression and catalytic activity of some mammalian hepatic CYPs, which play a central role in the biosynthesis and metabolism of various endogenous constituents, are regulated by androgens and estrogens [47]. The fact of that the decrease in the hepatic hydroxylation and demethylation activities was observed without none alterations in the microsomal protein levels or humid liver weight clearly indicates that the effect of ND and EX on liver enzymatic activity occurs through protein modification rather tan at the level of CYPs content regulation. A probable explication for the toxic effect caused by the ND in the studied enzymes, in present study, is that ND or a metabolite might occupy a Cytochrome P450 ligation site limiting the access of others substrates to active enzyme site. The lack of studies relating nandrolone decanoate effects on liver drug metabolizing phase I enzymes function linked to Cyp system difficult a data comparison.

In relation to physical exercise the results are conflicting. While Michaud et al. [24] observed none alterations, Kim et al. [48] finding increased levels. Lipid peroxidation induces both structural and functional injury to the cell organelle membranes [49]. AAS administration to rats beyond of to provoke hormonal perturbations might act as an exogenous chemical stressor and when associated with physical exercise enhance ROS generation.

Thus, increased liver ROS generation with decreased scavenging capacity seems a probable addictive mechanism responsible by the decreased N-demethylation and hydroxylation activities in treated and trained animals in present study. This hypothesis is probably since lipid peroxidation due increased ROS generation is associated with decreased Cytochrome P450-dependent enzyme activity [50,51]. Reinforcing this hypothesis, livers of rats which received ND and were submitted to the physical exercise (TT group) exhibit a lower ( $P<0.05$ ) metabolizing capability on antipyrine substrate in comparison with non-trained and treated (NTT) and trained non treated (TNT) groups, suggesting a raise to a power effect by physical exercise on ND effect. Additionally, Frenkl et al. [52] observed that rats submitted to forced exercise showed a decrease in aniline metabolism, confirming some of our results. Further, rats forced to exercise experience significantly elevated bile excretion of GSH and GSSG indicating a possible alteration in liver intracellular thiol homeostasis and scavenger capacity [53].

Recent investigation of comprehensive gene expression have reveled that tissues modify their gene profile in response to external environmental stressors. For example, chronic restraint stress up-regulates the expression of genes involved in lipid metabolism and detoxification in the liver to produce energy to meet demands imposed by the stress [54]. Is possible that chronic exposition to chemical stressors, as for example AAS and training, can modify the liver metabolic profile acting on proteins responsible by the catalytic activity.

In the other hand, hepatic glycogen seems implicated in generation and supply of equivalents reductors, in NADPH form, from the metabolizing enzymes [55]. As have been suggested that AAS are able of modify liver glycogen availability, this might be an additional form to ND and physical exercise provoke liver metabolizing enzymes activity perturbation.

Hepatic drug metabolizing activity is substrate dependent with differing substrate selectivity. By this in present study were utilized four different substrates to assay liver ND and EX effect on different CYPs. Aniline hydroxylase was utilized as probe for CYP 2E1 [56,57]; antipyrine hydroxylase for CYPs 1A2, 2B1/2, and 3A1 [58]; aminopyrine N-demethylase for CYPs 1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E11, and 2C12 [59]; caffeine demethylase for CYPs 1A2 and 1A1/2 [35]. As the resultant

inhibitory effect was similar from the four different substrates utilized, is probable that the ND and EX exerted a non-specific effect involving different family and sub-family of CYPs.

In conclusion, the present study to present important data on diminished drug-metabolizing activity by the liver of rats receiving nandrolone decanoate and submitted to physical training. Experiments to identify the molecular mechanisms and the CYPs involved in these effects are necessary to better understanding AAS and EX liver toxicity.

### **Acknowledgements**

Authors are grateful to the Clinical Laboratory by serum enzymes dosage and to the Center of Experimental Researches wherein was developed the running exercise, both pertaining to Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

The present study was developed as part of requirements for a Master thesis of Jaqueline A. G. Marino.

## References

- [1] C.D. Kochakian. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. *Wien. Med. Wochenschr.* 143 (1993) 359-363.
- [2] E.S. Lukas. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (1993) 61-68.
- [3] S.D. Titlestad, M., I. Lambert, M.P. Schweltnus, A survey to determine types and dosages of anabolic androgenic steroids used by competitive bodybuilders in South Africa, *S. Afr. J. Sports Med.* 1 (1994) 24-28.
- [4] S. Reents. *Sport and exercise pharmacology*. Champaign: Human Kinetics (2000) 344.
- [5] G.R. Dohle, M. Smit, R.F. Weber, Androgens and male fertility, *World J. Urol.* 21 (2003) 341-345.
- [6] A.C. Eklof, A.M. Thurelius, M. Gale, A. Rane, F. Sjoqvist, 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 pharmacology, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59 (2003) 571-577.
- [7] I. Velazquez, B.P. Alter, androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non Fanconi's conditions. *Am. J. Hematol.* 77 (2004) 257-267.
- [8] N.T. Shaidi, A review on the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.* 23 (2001) 1355-1390.
- [9] P.J. Snyder, Androgens. In: J.G.L.E., Hardman Limbird, Goodman & Gilman, A. (Eds), *The pharmacological Basis of Therapeutics*, tenth ed. New York: McGraw Hill, (2001) 1635-1648.
- [10] P.C. Ferrera, D.L. Putnam, V.P. Verdile, Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology*, 88 (1997) 218-220.
- [11] V. Di Belo. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 31 (1999) 514-521.

- [12] K. Mccarthy, Ventricular thrombosis and systemic embolism in bodybuilders: etiology and management, *Ann. Thorac. Surg.*, 70 (2000) 658-660.
- [13] K. Al-Ismail, W.C. Torreggianni, P.I. Munk, S. Nicolau, Gluteal mass in a bodybuilder: radiological depiction of a complication of anabolic steroid use. *Eur. Rad.* 12 (2002) 1366-1369.
- [14] Pope Jr., H.G.; D.L. Katz, Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use – A controlled study of 160 athletes. *Arch. Gen. Psych*, 51 (1994) 375-382.
- [15] C. Maravelias, A. Dona, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou. Adverse effects of anabolic steroid in athletes a constatnt threat. *Toxicology Letters.* 158 (2005) 167-175.
- [16] M.I. Kafrouni, R.A. Anders, S. Verma, Hepatotoxicity associated with dietary supplements containing anabolic steroids. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (7) (2007) 809-812.
- [17] A.M. Pavlatos, O. Fultz, M.J. Monberg, A. Vootkur, Review of oxymetholone A 17a-alkylated anabolic-androgenic steroid. *Clin. Therap.* 23 (2001) 789-801.
- [18] E. Cadenas, K.J. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 29 (2000) 222-230.
- [19] H. Lew, S. Pyke, A. Quintanilha, The effect of physical exercise on the antioxidative capacity of the liver. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 18 (1-3) (1987) 231-246.
- [20] S. Pyke, H. Lew, A. Quintanilha, Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 139 (3) 1986) 926-931.
- [21] A. Saborido, F. Molano, A. Megias, Effect of training and anabolic-androgenic steroids on drug metabolism in rat liver, *Medicine an Science in Sports and Exercise.* 23 (8) (1993) 215-822.
- [22] W.W. Day, J.A. Chesky, M, Weiner. Differential effects of swimming and running on microsomal metabolism in middle-aged and aged fisher 344 rats, *Mechanisms of Ageing and Development,* 63 (3) (1992) 275-286.



- [23] R. Frenkl, Ä. Györe, S.Z. Szeberényi, The effect of muscular exercise on the microsomal enzyme system of the rat liver, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 44 (2) (1980) 135-140.
- [24] T.J. Michaud, K.A. Bachamann, F.F. Andres, M.G. Flynn, G.P. Sherman, J. Rodríguez-Zayas, Exercise training does not alter Cytochrome P-450 content and microsomal metabolism, *Med. Scienc. Sports Exerc.* 26 (8) (1994) 978-82.
- [25] M. Dossing, S.K. Gupta, S. Frank, C.N. Corder, Effect of acute and chronic exercise on hepatic drug metabolism. *Clinical Pharmacokinetics.* 10 (5) (1985) 426-431.
- [26] S.M. Somani, S.K. Gupta, S. Frank, C.N. Corder. Effect of exercise on disposition and pharmacokinetics of drugs. *Drug Development Research* 20 (1990) 251-275.
- [27] D.W. Nebert, F.J. Gonzalez. P450 genes: structure, evolution and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 945-993.
- [28] A.L.L. Conncy. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19 (1967) 317-362.
- [29] J. Lund, P.G. Zaphiropoulos, A. Mode, M. Warner, J-A. Gustafsson, Homonal regulation of P-450 gene expression. *Adv. Pharmacol.* 22 (1991) 325-354.
- [30] D.A. Mugford, G.L. Kedderis, Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 30 (1998) 441-498.
- [31] H.G. Pope Jr., D.L. Katz, Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am. J. Psychiatry*, 145 (1988) 487-490.
- [32] K.N. Georgieva, N.P. Boyadjiev. Effects of Nandrolone Decanoate on  $VO_{2max}$ , Running Economy, and Endurance in Rats. *Med. Scienc. Sports Exerc.* 36 (8) (2004) 1336-1341.
- [33] P. Mazel, Experiments illustrating drug metabolism in vitro. In: *Fundamentals of Drug Disposition*, ed. B.N. La Du, H.G. Mandel, E.L. Way, Baltimore:Williams and Wilkins, 546-82.

- [34] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [35] W.G. Chung, H.K. Hoh, H.M. Kim, Y.N. Cha, Involvement of CYP3A1, 2B1, and 2E1 in C-8 hydroxylation and CYP 1A2 and flavin-containing monooxygenase in N-demethylation of caffeine: identified by using inducer treated rat liver microsomes that are characterized with testosterone metabolic patterns, *Chem. Biol. Interac.* 113 (1998) 1-14.
- [36] T. Nash, The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55 (1953) 412-22.
- [37] B.B. Brodie, J. Axelrod, The fate of antipyrine in man, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 98 (1950) 97-104.
- [38] G.W. Snedecor, W.G. Cochran. *Statistical Methods*. Seventh Edition. Iowa: Iowa State University Press, 1980.
- [39] E.F. Coyly. Metabolismo lipídico durante o exercício. *Sports Sci. Exch.* 15 (1997) 20-26.
- [40] T.S. Cunha, A.P. Tanno, M.J.C.S. Moura, F.K. Marcondes. Relation between anabolic androgenic steroid administration, aerobic physical training and glycogen supercompensation. *Rev. Bras. Med. Esp.* 1(3) (2005) 180E-184E.
- [41] J.A. Yu-Yahiro, R.H. Michael, D.V. Nasrallah, B. Schofiel. Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. *Am. J. Sports Med.* 17 (1989) 686-689.
- [42] H.G. Pope Jr., D.L. Katz, J.I. Hudson. Anorexia nervosa and 'reverse anorexia' among 108 male bodybuilders. *Compr. Psychiatry* 34 (1993) 406-409.
- [43] P. Guzelian, S. Mills, H.J. Fallon, Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J. Occup. Med.* 30 (1988) 791-796.

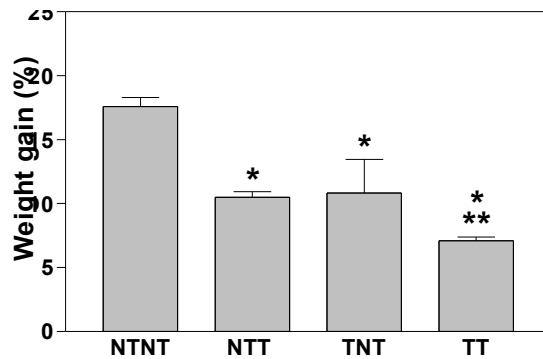
- [44] S.M. Doudar, C.S. Shaver, W.R. Snodgrass. Hepatotoxicity from hazardous chemicals. In: J.B. Sullivan Jr. and G.R. Krieger Eds. Hazardous Materials Toxicology – Clinical Principles of Environmental Health. William & Wilkins, 1992.
- [45] D.S. Pratt, M.M. Kaplan. Laboratory tests. In: E.R. Schiff, M.F. Sorell, W.C. Maddrey (Eds). Diseases of the liver. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 205-244.
- [46] L.Z. Benet, D.L. Kroetz, L.B. Sheiner, Farmacocinética: a dinâmica de absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman(Eds.) Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 3-20, 1996.
- [47] J. Lund. Hormonal regulation of P-450 gene expression. Adv. Pharmacol., 22 (1991) 325-54.
- [48] H.J. Kim, A.K. Lee, Y.G. Kim, S.C. Bu, S.H. Kim, C.H. Yang, O.K. Suh, S.G. Kim, M.G. Lee, Influence of 4-week and 8-week exercise training on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azosemide in rats, Life Sci. 70 (2002) 2299-2319.
- [49] A. Wiserman. Elimination of major sides effects due to ROS of therapeutical through biotransformation control of the 57 cytochromes P450 isoenzymes. Med. Hypoth. 64 (2005) 802-805.
- [50] E.A. Chaves, P.P. Pereira Jr., R.S. Fortunato, D.P. Carvalho, A.C.C. Carvalho, M.O. Masuda, M.F. Oliveira, J.H.M. Nascimento, Nandrolone decanoate impairs exercise induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 99 (2006) 223-230.
- [51] T. Sato, H. Yamamoto, N. Sawada. Restraint stress alters the duodenal expresión of genes important for lipid metabolism in rat. Toxicology. 227 (2006) 248-261.
- [52] R. Frenkl, Ä. Györe, S.Z. Szeberényi, The effect of muscular exercise on the microsomal enzyme

system of the rat liver, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 44 (2) (1980) 135-140.

- [53] J.B. Watkins 3rd,; S.T. Crawford,; R.A. Sanders,. Chronic voluntary exercise may alter hepatobiliary clearance of endogenous and exogenous chemicals in rats. *Drug Metab. Dispos.* 22 (1994) 537-543.
- [54] H.I. Ha, K.S. Kim, Y.I. Yeom, J.K. Lee, P.I. Han. Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver. *Toxicol. Lett.* 146 (2003) 49-63.
- [55] R.G. Thurman, F.C. Kauffman. Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol. Rev.* 31 (1980) 229-251.
- [56] J.Y. Ko, S.S. Park, B.J. Song, C. Patten, Y. Tan, Y.C. Hah, C.S. Yang, H.V. Gelboin. Monoclonal antibodies to ethanol-induced rat liver cytochrome P-450 that metabolises aniline nitrosamines. *Cancer Res.* 47 (1987) 3101-3109.
- [57] J.L. Raucy. Risk assessment: toxicity from chemical exposure resulting from enhanced expression of CYP2E1. *Toxicology.* 105 (1995) 217-223.
- [58] N. Blanchard, L. Richerl, B. Notter, F. Delobel, P. David, P. Coassolo, T. Lave. Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (2004) 189-99.
- [59] X. Wei, C. Loi, D.L. Schumucker, R.E. Vestal. Characterization of the independent and combined effects of two inhibitors on oxidative drug metabolism in rat liver microsomas. *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 1657 - 1663.

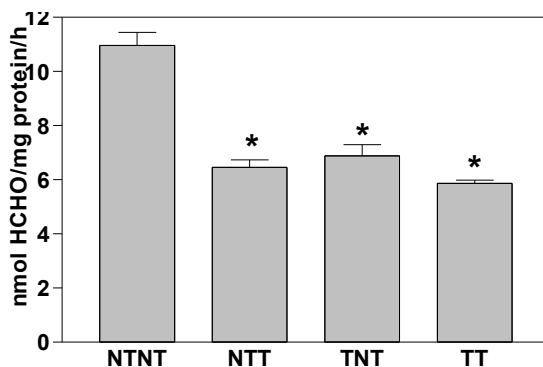
## Figures

Fig.1 – Body weight gain of rats receiving nandrolone decanoate and submitted to physical exercise.



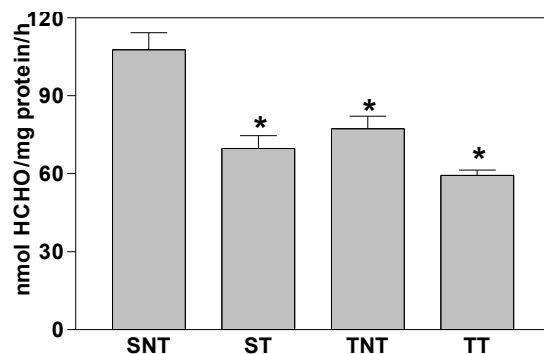
Values are expressed as mean of weight gain percentage during six weeks  $\pm$  SEM of 7 animals/group. NTNT= non-trained not treated; NTT= non-trained treated; TNT= trained not treated; TT= trained and treated. \* $P < 0.05$  –  $P < 0.01$  of NTNT \*\* $P < 0.05$  of NTT (Tukey-Kramer test).

Fig. 2 – Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat liver caffeine demethylase enzyme activity.



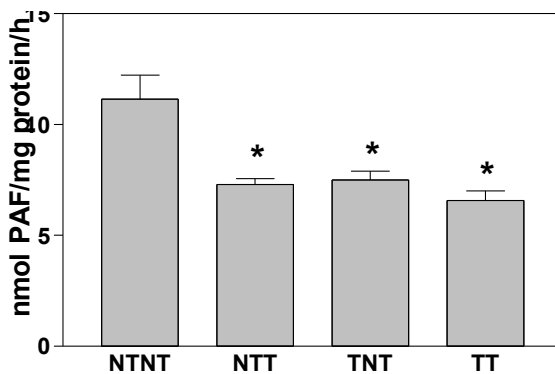
Values are express as mean  $\pm$  SEM of 7 animals/group. NTNT= non-trained not treated; NTT= non-trained treated; TNT= trained not treated; TT= trained and treated. \* $P$ <0.001 of NTNT (Tukey-Kramer test)

Fig. 3 - Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat liver aminopyrine *N*-demethylase enzyme activity.



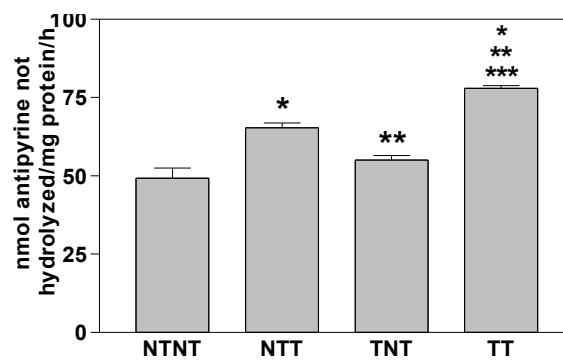
Values are express as mean  $\pm$  SEM of 7 animals/group. NTNT= non-trained not treated; NTT= non-trained treated; TNT= trained not treated; TT= trained and treated. \* $P$ <0.001 -  $P$ <0.01 of NTNT (Tukey-Kramer test).

Fig. 4 – Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat liver aniline hydroxylase enzyme activity.



Values are express as mean  $\pm$  SEM of 7 animals/group. NTNT= non-trained not treated; NTT= non-trained treated; TNT= trained not treated; TT= trained and treated. \* $P$ <0.001 -  $P$ <0.01 of NTNT (Tukey-Kramer test).

Fig. 5 – Effect of nandrolone decanoate and physical exercise on rat liver antipyrine hydroxylase enzyme activity.



Values are express as mean  $\pm$  SEM of 7 animals/group. NTNT= non-trained not treated; NTT= non-trained treated; TNT= trained not treated; TT= trained and treated. \* $P$ <0.001 of NTNT \*\* $P$ <0.001 -  $P$ <0.01 of NTT \*\*\* $P$ <0.001 of TNT (Tukey-Kramer test).

