

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JAMILI DIAS BERNARDINO SANTOS

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA/HIPOPOTEICA E ESTEROIDE
ANABOLIZANTE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO, NÍVEIS DE CITOCINAS,
MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG

2016

JAMILI DIAS BERNARDINO SANTOS

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA/HIPOPOTEICA E ESTEROIDE
ANABOLIZANTE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO, NÍVEIS DE CITOCINAS,
MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicada a Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Romulo Dias Novaes

Co-orientador: Prof. Dr. Ivo Santana Caldas

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Jamili Dias Bernardino

Efeito da dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante sobre o perfil lipídico, níveis de citocinas, morfologia e função hepática em camundongos / Jamili Dias Bernardino Santos. -- Alfenas/MG, 2016.

55 f.

Orientador: Romulo Dias Novaes.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Fígado Gorduroso. 2. Hormônios Esteroides Gonadais. 3. Alimentos,
Dieta e Nutrição. I. Novaes, Romulo Dias. II. Título.

CDD-616.07

JAMILI DIAS BERNARDINO SANTOS

“EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA/HIPOPOTEICA E ESTEROIDE ANABOLIZANTE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO, NÍVEIS DE CITOCINAS, MORFOLOGIA E FUNÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS”.

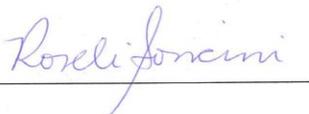
A Banca Examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Fisiopatologia

Aprovado em: 26/07/2016

Prof. Dr. Romulo Dias Novaes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Roseli Soncini
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Rafaela Bergmann Strada de Oliveira
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS-MG

Assinatura: 

Dedico primeiramente a Deus, a minha mãe Odete Dias Bernardino e ao meu pai já falecido Otacílio Bernardino, ao meu esposo Luiz Henrique Gomes Santos, familiares e amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL pela oportunidade oferecida

Ao Prof^o Dr. Rômulo Dias Novaes, meu orientador e ao Prof^o Ivo Santana Caldas, meu co-orientador pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação pelo incentivo à produção científica.

As secretárias Maria Antonieta e Adriana pela orientação e atenção durante a realização deste trabalho.

Aos bibliotecários pelo suporte durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da Pós-Graduação pelo companheirismo e acolhimento nos momentos difíceis.

Aos técnicos do biotério de animais pela ajuda na realização deste trabalho.

As alunas de iniciação científica e amigas Rafaela e Natanny pela grande ajuda durante a realização desta etapa da minha vida.

À minha mãe querida Odete, que amo tanto e que sem ela não seria possível à realização deste trabalho. Muito obrigada pelo incentivo, apoio incondicional e amor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amor, esposo, companheiro de todas as horas Luiz Henrique pelo apoio, incentivo e dedicação. Obrigada pela compreensão, por ser o melhor exemplo de determinação, me espelho em você, tem uma enorme contribuição no sucesso desta etapa.

Aos meus queridos sogros Nonato e Gabriela, e também minha cunhada linda Juliana pelo incentivo, carinho e apoio em todos os momentos.

À minha prima Joseana pelo incentivo e ajuda em vários momentos desta etapa.

À Prefeitura Municipal de Juruiaia pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao coordenador e aos motoristas da Prefeitura de Juruiaia pelo apoio, sempre prontos para me ajudar e tantas vezes possibilitaram com muito carinho o transporte para realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, do Centro de Especialidades de Juruiaia pela compreensão, apoio e companheirismo.

Aos meus queridos pacientes que sempre apoiaram e compreenderam a realização desta etapa na minha vida.

À todos que me ajudaram e me apoiaram direta ou indiretamente serei eternamente grata.

A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.

(John Ruskin, 1819)

RESUMO

As dislipidemias apresentam elevada prevalência em todo o mundo e estão fortemente associadas com a ocorrência de doenças cardiovasculares. Embora a etiologia das dislipidemias seja complexa e multifatorial, a patogênese dessas condições tem sido associada ao perfil de ingestão alimentar. Em modelos animais, a exposição a dietas hiperlipídicas/hipercalóricas é extremamente relevante para investigar o efeito do perfil dietético sobre o metabolismo e estrutura de múltiplos órgãos e tecidos. Além de interferir no metabolismo energético celular, a utilização de doses supra-fisiológicas de esteroides anabolizantes tem sido frequentemente associada à elevada toxicidade, causando doenças renais, cardiovasculares e hepáticas de complexidade variável. Está bem estabelecido que o perfil de ingestão alimentar possa aumentar ou atenuar a toxicidade induzida por diversas drogas, inclusive hormônios, oferecendo um fator de risco ou proteção ao organismo. Assim, o presente estudo investigou o efeito da dieta rica em gordura trans e esteroide anabolizante sobre o perfil lipídico, estrutura e função hepática em camundongos. Sessenta camundongos C57BL/6 fêmeas com 12 semanas de idade foram igualmente randomizados em 5 grupos: Grupo 1: Dieta padrão; Grupo 2: Dieta padrão + cipionato de testosterona (20 mg/kg); Grupo 3: Dieta hiperlipídica; Grupo 4: Dieta hiperlipídica + cipionato de testosterona (10 mg/kg); Grupo 5: Dieta hiperlipídica + cipionato de testosterona (20 mg/kg). Quando administrado em animais alimentados com a dieta padrão (normolipídica e normocalórica), o anabolizante não induziu alterações morfofuncionais hepáticas e metabólicas deletérias. Ao contrário, o anabolizante foi benéfico ao reduzir os níveis circulantes de LDL colesterol e das enzimas de função hepática nesses animais. Em combinação com a DHH, o anabolizante agravou a dislipidemia, reduzindo os níveis circulantes de HDL colesterol, aumentando os níveis de triglicérides e a gravidade da esteatose hepática em camundongos. Considerados em conjunto, os resultados permitiram concluir que o perfil dietético é capaz de interagir de forma complexa com os esteroides anabolizantes, modificando as características de susceptibilidade e resistência ao dano morfofuncional hepático e metabólico sistêmico em camundongos.

Palavras-chave: Esteatose hepática. Hormônios esteroides. Nutrição experimental.

ABSTRACT

Dyslipidemias exhibit high prevalence worldwide and are strongly associated with the occurrence of cardiovascular diseases. Although the etiology of dyslipidemia is complex and multifactorial, the pathogenesis of these conditions has been associated to the food intake profile. In animal models, exposure to high-fat diets (HFD) constitutes robust experimental models to investigate the effect of dietary profile on metabolism, organ structure and function. Beyond interfere with cellular energy metabolism, use of supraphysiological doses of anabolic steroids has been often associated with high toxicity, causing renal, cardiovascular and liver diseases. It is well established that the food intake profile can increase or reduce the toxicity induced by several drugs, including hormones, offering a risk or protection factor to the organism. The present study investigated the effect of a HFD and anabolic steroid on body composition, lipid profile, liver function and structure in mice. Sixty C57BL/6 female, 12 weeks of age were randomized equally into 5 groups: Group 1: Standard Diet; Group 2: Standard Diet + testosterone cypionate (20 mg / kg); Group 3: HFD; Group 4: HFD + testosterone cypionate (10 mg / kg); Group 5: HFD + testosterone cypionate (20 mg / kg). When administered in animals fed a standard diet (normolipidic and normocaloric), the anabolic did not induce deleterious metabolic or morphofunctional changes in liver tissue. Conversely, anabolic was beneficial in reducing the circulating levels of LDL cholesterol and liver function enzymes in these animals. In combination with HFD, anabolic steroid worsened dyslipidemia, reducing circulating levels of HDL cholesterol, increasing triglycerides levels and the severity of hepatic steatosis in mice. Taken together, the results showed that HFD was able to interact with anabolic steroids in a complex way, modifying the characteristics of susceptibility and resistance to morphofunctional liver damage and systemic lipid metabolism dysfunction in mice.

Keywords: Fatty liver disease. Steroid hormones. Experimental nutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas experimentais.....	25
Tabela 2 - Parâmetros biométricos e ingestão dietética em camundongos controle e aqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ganho de massa corporal.....	28
Figura 2 - Densidade de número (QA) e área de adipócitos.....	29
Figura 3 - Estrutura hepática e níveis de esteatose micro e macrovesicular.....	30
Figura 4 - Níveis plasmáticos de enzimas de função hepática e bilirrubina total.....	31
Figura 5 - Perfil lipídico plasmático.....	32
Figura 6 - Níveis de citocinas no plasma.....	33

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1	Dislipidemia e dieta.....	13
1.2	Esteroides anabolizantes.....	14
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	METODOLOGIA.....	20
4.1	Grupos experimentais.....	20
4.2	Aspectos éticos.....	20
4.3	Protocolo experimental.....	21
4.4	Análise de eficiência alimentar e biometria.....	21
4.5	Análises bioquímicas.....	22
4.6	Quantificação de citocinas.....	22
4.7	Análise histomorfométrica do tecido adiposo.....	23
4.8	Análise da esteatose hepática.....	23
4.9	Análise estatística.....	24
5	RESULTADOS.....	26
6	DISCUSSÃO.....	34
7	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 REVISÃO DE LITERATURA

A incidência e prevalência de doenças metabólicas têm aumentado em todo o mundo (HAMAGUCHI et al., 2005; SCHWENK et al., 2013). Entre todas as doenças crônicas degenerativas não transmissíveis as dislipidemias merecem atenção, pois tanto de forma isolada quanto associada a outros fatores de risco elas estão fortemente associadas com a ocorrência de doenças cardiovasculares e acarretam enormes prejuízos socioeconômicos (SIDNEY et al., 2013). As dislipidemias têm sido amplamente associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente relacionadas a eventos cardiovasculares como aterosclerose, coronariopatias, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva (BOULLART et al., 2012; HAMAGUCHI et al., 2005; DAMANI; TOPOL, 2011). Embora a etiologia das dislipidemias seja complexa e multifatorial, a patogênese dessas condições tem sido associada a um importante componente genético, o qual pode ser influenciado por fatores ambientais e hábitos de vida, especialmente o perfil de ingestão alimentar (SCHWENK et al., 2013).

1.1 Dislipidemia e dieta

Existem evidências de que o perfil dietético apresenta uma notável capacidade de modificar o metabolismo celular, podendo levar a uma profunda reprogramação molecular, que inclui a modulação dos genes que regulam a estrutura, a função, o crescimento e a sobrevivência celular (CERVATO et al., 1997; SCHWENK et al., 2013). Estas características têm sido provadas para dietas hipercalóricas ricas em carboidratos e lipídios, que têm sido amplamente aplicadas como modelos clássicos de dislipidemia e obesidade em animais por simular um padrão de alimentação cada vez mais comum em populações humanas. Os modelos animais expostos a dietas hiperlipídicas/hipercalóricas têm grande aplicabilidade em estudos pré-clínicos para investigar o impacto das diferentes intervenções na prevenção e tratamento de condições patológicas associadas às dislipidemias. Além disso, apresentam potencial utilidade para investigar o efeito do perfil dietético sobre o metabolismo e estrutura de múltiplos órgãos e tecidos (ROSINI et al., 2012; SAMPEY et al., 2011).

As dietas hiperlipídicas/hipercalóricas representam modelos úteis para o estudo da obesidade humana, pois induzem hiperfagia voluntária e rápido ganho de massa corporal. Ainda que por períodos curtos, cerca de quinze dias, estas dietas podem produzir aumentos significativos na adiposidade corporal em modelo animal. A alta adiposidade está relacionada mais a um incremento da gordura visceral do que dos depósitos subcutâneos (SAMPEY et al., 2011). Além disso, tem sido descrito que as dietas hiperlipídicas/hipercalóricas ainda são capazes de promover um estado pré-diabético, com aumentos dos níveis de glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados no plasma (BURTON-FREEMAN; SCHNEEMAN, 1996; EBAL et al., 2007; SAMPEY et al., 2011).

Tradicionalmente, a manipulação dietética tem sido amplamente utilizada em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de modelos experimentais de doenças metabólicas (FAZIO; LINTON et al., 2001). Assim, um pré-requisito para o estudo das dislipidemias é o desenvolvimento de modelos experimentais confiáveis, reprodutíveis e representativos dessas afecções de saúde (RUSSELL; PROCTOR, 2006). Mediante exposição à dietas hipercalóricas, especialmente hiperlipídicas, animais de experimentação como coelhos, ratos e camundongos desenvolvem dislipidemia e alterações patológicas em órgãos alvo como aterosclerose e esteatose hepática (SCHREYER et al., 2002). Devido à patogênese multifatorial das dislipidemias, amplo espectro de manifestações patológicas em múltiplos órgãos, e atuação como fator predisponente para o desenvolvimento de comorbidades, tem se tornado cada vez mais relevante investigar como e até que ponto as dislipidemias e os hábitos de vida interagem para restringir ou potencializar o risco para afecções de saúde.

1.2 Esteróides anabolizantes (EA)

Além da dieta, diversas drogas são capazes de interferir no metabolismo energético celular, podendo aumentar ou diminuir o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas. É amplamente reconhecido que os hormônios esteróides, especialmente a testosterona e seus diversos derivados, atuam em múltiplas vias metabólicas que regulam o metabolismo energético. Além disso, a testosterona atua como um hormônio anabólico de ação sistêmica que modifica a função e estrutura dos órgãos e tecidos corporais (GLAZER, 1991).

Esteróides são hormônios produzidos pelo córtex da supra-renal ou pelas gônadas, os quais são responsáveis por diversas funções no organismo, tais como controle do

metabolismo geral e determinação das características sexuais secundárias masculinas (KUHN, 2002). A testosterona exerce efeitos designados como androgênicos e anabólicos em uma extensa variedade de tecidos alvo andrógeno-dependentes, incluindo o sistema reprodutor, o sistema nervoso central, a glândula pituitária anterior, o rim, o fígado, os músculos e o coração. Os efeitos androgênicos da testosterona são responsáveis pelo desenvolvimento do trato reprodutor masculino e das características sexuais secundárias, enquanto que os efeitos anabólicos estimulam a fixação do nitrogênio e aumentam a síntese proteica celular (SHAHIDI, 2001). A atividade anabólica da testosterona e de seus derivados é manifestada primariamente em sua ação miotrófica, que resulta em aumento da massa muscular por aumentar a síntese proteica no músculo e por controlar os níveis de gordura corporal (KAM; YARROW, 2005).

Os esteróides anabólicos androgênicos são substâncias sintéticas derivadas da testosterona, cuja utilização na clínica médica é aprovada por órgãos regulatórios, como a Food and Drugs Administration (FDA) nos Estados Unidos da América (KUHN, 2002) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, para o tratamento de doenças específicas sob rigorosa supervisão médica. Os esteróides anabolizantes são utilizados em doses terapêuticas para o tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos, na recuperação de cirurgias e atrofia muscular por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra e reduzindo a deposição de tecido adiposo. Também são utilizados no tratamento da osteoporose, do câncer de mama, estágios avançados da síndrome da imunodeficiência adquirida humana, em pacientes com doença renal crônica submetidos à diálise, em casos de queimaduras graves, distrofias musculares, e anemias, uma vez que estimulam a eritropoiese (CELOTTI; CESI, 1992; CREUTZBERG et al., 2003).

O potencial terapêutico da atividade anabólica da testosterona em várias condições catabólicas tem levado à síntese de muitos derivados com atividade biológica prolongada, os quais são menos androgênicos e mais anabólicos. Os esteróides anabolizantes são um subgrupo dos andrógenos derivados da testosterona, um hormônio esteróide com 19 átomos de carbono cuja fórmula estrutural serve como base para todos os anabolizantes. Como a testosterona tem aproximadamente a mesma ação androgênica e anabólica (razão 1:1), os EA são desenvolvidos por meio de variação dos grupos funcionais em diversas regiões na cadeia do esteróide na tentativa de dissociar a ação androgênica da ação anabólica (KAM; YARROW, 2005).

Embora os EA tenham sido desenvolvidos para o tratamento medicamentoso de diversas doenças, especialmente crônicas progressivas e espoliativas, essas substâncias vêm sendo indiscriminadamente utilizadas no meio esportivo por indivíduos aparentemente saudáveis para melhorar o desempenho físico de atletas e aumentar a massa muscular devido à suas propriedades anabólicas, as quais são maximizadas nestas substâncias (KUHN, 2002). Tradicionalmente, atletas e praticantes de recreativos de exercícios físicos são os principais consumidores dessas substâncias para fins estéticos e aumento do desempenho físico (KAM; YARROW, 2005). Nesses casos, a utilização de EA é frequentemente associada a abusos que expõe seus usuários à riscos de saúde. A utilização prolongada de doses supra fisiológicas de EA, especialmente em indivíduos saudáveis, tem sido frequentemente associada à elevada toxicidade e danos funcionais e estruturais em órgãos alvo além de distúrbios comportamentais, de humor e de memória como aumento da libido, hiperatividade, euforia, irritabilidade, agressividade, ansiedade, confusão mental e delírios (SHAHIDI, 2001). As alterações patológicas físico-funcionais mais marcantes do abuso de anabolizantes manifestam-se como alteração da tolerância à glicose com aumentada resistência à insulina, diminuição da síntese endógena de testosterona e hormônios da tireoide, disfunção hepática como esteatose, hepatite, fibrose e adenomas hepatocelulares; e danos cardiovasculares de complexidade variável (PERTUSI et al., 2001; SHAHIDI, 2001; SULLIVAN et al., 1998).

Diversos estudos vêm demonstrando uma forte associação do uso de EA com adaptações patológicas no sistema cardiovascular (COHEN et al., 1986; GLAZER, 1991; NIEMINEN et al., 1996; KAM; YARROW, 2005). Em animais de experimentação, mudanças histopatológicas tais como inflamação e fibrose miocárdica foram observadas em amostras de autópsia em ratos após exposição à EA (NIEMINEN et al., 1996). Em humanos foram descritas alterações como hipertrofia cardíaca, prejuízo no fluxo coronário e perfusão cardíaca, hiperatividade autonômica simpática, prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio, trombozes, fibrilação ventricular, além de associação com patologias como infarto agudo do miocárdio, aterosclerose e insuficiência cardíaca (TAGARAKIS et al., 2000; URHAUSEN et al., 2004; WOODIWISS, et al., 2000). Além da ampla variedade de morbidades decorrentes do uso indiscriminado de EA, Kam & Yarrow (2005) apontaram um fato alarmante ao destacar que em longo prazo, o risco de mortalidade entre usuários abusivos dessas substâncias é de aproximadamente quatro vezes maior do que em não-usuários.

Estudos prévios indicaram a influência da testosterona e seus análogos sobre o metabolismo lipídico, com marcante modificação dos níveis séricos de colesterol e suas frações em animais e humanos (GLAZER, 1991; SULLIVAN et al., 1998). Em humanos, a utilização de EA foi capaz de modificar o metabolismo lipídico diminuindo os níveis plasmáticos de HDL (lipoproteínas de alta densidade) colesterol, indicando marcante potencial para aumentar o risco de aterosclerose (EBENBICHLER et al., 2001). Também tem sido descrito importante efeito dos EA sobre a elevação dos níveis plasmáticos de triglicérides (COHEN et al., 1986). Além disso, foi previamente demonstrado que ao aumentar a atividade da lipase triglicerídea hepática (HTGL), os EA conduzem a diminuição nos níveis plasmáticos de HDL (GLAZER, 1991) e ao aumento nas concentrações plasmáticas de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) colesterol como resultado do aumentado do catabolismo das VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), podendo potencializar a aterosclerose (BALDO-ENZI et al., 1990).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Em 2001, os medicamentos lideraram a lista de agentes causadores de intoxicações em seres humanos no Brasil; comportamento que vêm sendo observado desde 1996, de acordo com os registros do Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas. Nesse cenário, os EA e derivados anfetamínicos se destacaram entre os medicamentos utilizados como drogas de abuso (NOTO et al., 2003). Nas últimas três décadas o uso de EA com finalidade não medicamentosa se difundiu para a população em geral. Atualmente, essas drogas estão sendo utilizados em todo o mundo por milhões de indivíduos para aumentar a sua força física e para fins estéticos. Em curto prazo, a utilização de EA parece ter poucas consequências médicas graves, mas, em longo prazo, tem sido associada a sintomas físicos e psicológicos debilitantes e aumento da morbimortalidade, principalmente relacionada às doenças cardiovasculares e hepáticas (SAGOE et al., 2014).

Sabe-se que além da dose administrada, a toxicidade de diferentes drogas é influenciada por múltiplos fatores, incluindo o perfil de ingestão alimentar do indivíduo. Assim, esse fator pode interagir para aumentar ou atenuar a toxicidade induzida por essas drogas, oferecendo um fator de risco ou proteção ao organismo. Mediante revisão de literatura, não foram encontrados trabalhos investigando o efeito combinado da ingestão de dieta hiperlipídica e o uso de EA. Assim, o presente estudo propõe investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabólico no perfil lipídico e inflamatório, remodelamento cardiovascular e hepático de camundongos. Considerando uma potencial interferência, os resultados poderão ampliar o conhecimento sobre o impacto da ingestão lipídica sobre a toxicidade atribuída ao uso suprafisiológico dos EA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante sobre o perfil lipídico, níveis de citocinas, morfologia e função hepática em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica e esteroide anabólico sobre o perfil lipídico de camundongos.
- Investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica e esteroide anabólico sobre a composição corporal de camundongos.
- Investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica e esteroide anabólico sobre parâmetros de função hepática de camundongos.
- Investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica e esteroide anabólico sobre os níveis plasmáticos de citocinas pró e anti-inflamatórias em camundongos.
- Investigar o efeito da interação entre dieta hiperlipídica e esteroide anabólico sobre a morfologia cardíaca, vascular e hepática em camundongos.

4 METODOLOGIA

4.1 Grupos experimentais

Sessenta camundongos C57BL/6 fêmeas (n= 60), com 12 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) e mantidos no Biotério de experimentação animal do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (BioCD) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 ° C) com umidade relativa do ar (60-70%), e ciclos com 12/12 de luz e escuridão por dia. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno (n= 6 por caixa) nas dimensões 24,5 cm x 30 cm x 13 cm (largura × comprimento × profundidade) com cama de maravalha autoclavada seca. Os animais foram igualmente randomizados em cinco grupos com 12 animais em cada grupo de acordo com o tratamento recebido como segue: **Grupo 1 (G1)**: Dieta padrão; **Grupo 2 (G2)**: Dieta padrão + cipionato de testosterona (20 mg/kg); **Grupo 3 (G3)**: Dieta hiperlipídica/ hipoproteica; **Grupo 4 (G4)**: Dieta hiperlipídica/ hipoproteica + cipionato de testosterona (10 mg/kg); **Grupo 5 (G5)**: Dieta hiperlipídica/ hipoproteica + cipionato de testosterona (20 mg/kg).

4.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, Brasil (Protocolo: 579/2014). O cálculo do tamanho amostral (n=12 por grupo) baseou-se no desvio padrão, nível de significância de 5% e poder do teste de 95%, admitindo-se que as variáveis são quantitativas e instáveis. Além disso, foi considerada a razão de sobrevivência e mortalidade de 1:1 com probabilidade de $P = \frac{1}{2}$ para ambos os casos, bem como para aumentar ou diminuir as variáveis de interesse (ARMITAGE; BERRY, 1994). Assim, considerando o nível de significância $\alpha = 0,05$, o número mínimo significativo de animais utilizados na análise estatística foi de $p = (1/2)$ eventos. Nesse caso,

admitindo-se 50% de mortalidade a confiabilidade dos testes estatísticos ainda pode ser mantida uma vez que, se $n = 5$, $P = (1/2)^5$ ou $P = 0,03$; assim, $P < 0,05$. Por esses motivos, o número de repetições foi necessário para adequada análise e interpretação dos resultados (NOVAES et al., 2013).

4.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental teve duração de 12 semanas e os animais receberam dieta e água *ad libitum*. Foi utilizada dieta padrão com a seguinte composição: Proteína Bruta 22 a 22,5%, lipídeos 4,4 a 4,6% e carboidratos de 53 a 55% (Nuvilab Cr-1[®], São Paulo, SP, Brasil). A dieta hiperlipídica foi produzida adicionando-se 60% de lipídios à dieta padrão (CATA-PRETA et al., 2011). A composição nutricional e o valor energético das dietas são descritos na Tabela 1. Os grupos tratados com esteroide anabolizante receberam injeção intraperitoneal de cipionato de testosterona (Deposteron[®], EMS, Hortolândia, SP, Brasil) nas doses de 10 (G4) e 20 mg/kg (G2 e G5) de peso corporal três vezes por semana com intervalo de 24 horas entre cada aplicação. Após 12 semanas, 24 horas após a última aplicação, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca para exsanguinação após anestesia com administração intraperitoneal de tribromoetanol (250 mg/kg). O sangue foi coletado em tubos contendo heparina e centrifugado para obtenção do plasma que foi utilizado em análises bioquímicas e ensaio imunoenzimático. Foi realizada toracotomia e lapatoromia mediana para coleta do fígado e gordura visceral.

4.4 Análise de eficiência alimentar e biometria

A ingestão dietética foi avaliada pelo registro semanal do consumo de dieta. A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente. Para avaliar a eficiência alimentar, no início e ao final do experimento, foram obtidos os seguintes parâmetros: coeficiente de eficiência alimentar (CEA), massa corporal (g), comprimento focinho ânus (cm), índice de

Lee, índice de massa corporal (IMC), e taxa específica de ganho de peso (TEP, g/kg). O CEA foi estimado pela relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido: $CEA = \frac{\text{massa final (g)} - \text{massa (g) inicial}}{\text{quantidade total de alimento ingerido no período (g)}}$ (CAMPBELL *et al.*, 1963). A massa corporal foi aferida por pesagem direta e os parâmetros de comprimento determinados com a utilização de fita métrica. O índice de Lee foi determinado por meio da raiz cúbica do resultado obtido na divisão entre massa corporal (g) pelo comprimento nasoanal (cm) do animal. O IMC foi determinado a partir da relação entre peso corporal (g) /comprimento nasoanal² (cm²). A TEP foi estimada por meio da relação entre: $dM/Mt1$, em que dM representa o ganho de massa corporal durante o período experimental (massa final [t2] – massa inicial [t1]) e $Mt1$ é a massa corporal do animal em t1 (início do experimento) (NOVELLI ET *et al.*, 2007).

4.5 Análises bioquímicas

O perfil lipídico foi avaliado por meio da quantificação dos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos. Adicionalmente, foi realizada a quantificação dos marcadores de função hepática aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, e bilirrubina total. As análises bioquímicas foram realizadas por meio de espectrofotometria, utilizando kits comerciais e as instruções fornecidas pelo fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

4.6 Quantificação de citocinas

A expressão de citocinas no plasma foi avaliada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche. Para a dosagem de citocinas placas de 96 poços com alta afinidade para proteínas foram sensibilizadas com anticorpos de captura para IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e MIP-1 α . 50 μ L do plasma foram adicionadas aos poços e incubadas. As placas foram lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados. Avidina conjugada à

peroxidase foi adicionada aos poços e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagens das placas a reação foi revelada com tampão de revelação (0,5 mg/mL de ortofenilenodiamino (OPD), diluído em tampão citrato, pH 5,0 contendo 0,05% de H₂O₂). Após 15 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4N. A leitura das absorvâncias foi medida a 492 nm em leitor de ELISA (ELx50, Bio-Tek Instruments). A quantificação de citocinas foi determinada por meio de obtenção de curva padrão, utilizando citocinas recombinantes com concentrações conhecidas.

4.7 Análise histomorfométrica do tecido adiposo

Fragmentos do tecido adiposo visceral foram fixados em solução tamponada de Paraformaldeído a 10% (Tampão Fosfato 0,1 M, pH= 7,4) durante 48 horas. Após desidratação os fragmentos foram incluídos em resina histológica, obtendo-se cortes semi-seriados em micrótopo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha), com 3 µm de espessura e intervalo de 100 µm para evitar a análise de uma mesma área histológica. A partir dos cortes corados com azul de toluidina e montados sobre lâmina histológica, foram obtidas imagens utilizando-se câmera fotográfica digital (DsFi1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas com a objetiva de 40× por meio de programa de captura de imagens (NIS-Elements, Nikon, Tóquio, Japão). A densidade de número de adipócitos por unidade de área histológica (Q_A) foi determinada pelo método estereológico como $Q_A = \Sigma Q^- / At$, onde ΣQ^- denota o número total de perfis de adipócitos na área de teste At . A área dos adipócitos foi avaliada diretamente por meio de função de contorno utilizando o programa Image Pro-plus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) (NOVAES et al., 2013).

4.8 Análise da esteatose hepática

Fragmentos do lóbulo mediano foram fixados em solução tamponada de Paraformaldeído a 10% (Tampão Fosfato 0,1 M, pH= 7,4) durante 48 horas à temperatura ambiente. Os fragmentos foram desidratados em etanol e embebidos em resina histológica. Foram obtidos cortes semi-seriados em micrótomo rotativo com 3 μm de espessura. A esteatose foi avaliada em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina por meio da estimaco estereolgica da densidade volumtrica de gotculas de gordura (V_v , %) no tecido heptico (CATTA-PRETA et al., 2011). A V_v foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte frmula: $V_v = PP \text{ (gotculas lipdicas)}/PT$, em que PP  o nmero de pontos que incidem sobre gotculas lipdicas e PT  o nmero total de pontos do sistema de teste (NOVAES et al., 2013). Para a anlise estereolgica, um sistema de teste com 300 pontos foi usado em uma rea teste padro (A_t) de $73 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Para evitar anlises repetidas da mesma rea histolgica, foi utilizada uma a cada vinte seces. Foram analisados 50 campos histolgicos em cada grupo obtidos aleatoriamente com lente objetiva de 40x, em um total de $3.65 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ da rea do fgado. A anlise morfolgica foi realizada utilizando o programa Image Pro-plus 4,5[®].

4.9 Anlise estatstica

Os resultados foram representados como mdia e desvio padro (mdia \pm DP). A normalidade na distribuio de dados foi avaliada por meio do teste D'agostino-Pearson. Dados paramtricos foram comparados por meio da anlise de varincia unifatorial (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparaes mltiplas. Dados no paramtricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As anlises estatsticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism (verso 5.0).

A composio das dietas encontra-se na Tabela 1. A DHH apresentou 60% de lipdios e elevado valor energtico (5802 kcal/kg) comparada  dieta controle com 10% de lipdios e menor valor energtico (3713 kcal/kg).

Tabela 1- Composição e conteúdo energético das dietas experimentais.

Conteúdo (g/kg)	DP	DH/H
Caseína	140	70
Amido de milho	560,7	206,7
Sacarose	100	50
Óleo de soja	100	-
Gordura vegetal hidrogenada	-	600
Fibras	50	25
Mix vitamínico	10	10
Mix mineral	35	35
L-Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Total (g)	1000	1000
Energia (kcal/kg)	3713	5802
Carboidrato (%)	71	28
Proteína (%)	14	7
Lipídio (%)	10	60

Fonte: Do autor

Nota: DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica. Os mix de vitaminas e minerais foram incorporados de acordo com o guia AIN-93.

5 RESULTADOS

Os animais alimentados com dieta padrão e tratados com anabolizante apresentaram maior taxa específica de ganho de peso, ingestão de dieta e energia, coeficiente de eficiência alimentar, índice de Lee e maior massa corporal final ($p < 0,05$). Os grupos que receberam a DHH isolada ou combinada com o anabolizante apresentaram parâmetros biométricos semelhantes em relação ao grupo tratado com a DP ($p > 0,05$), os quais foram reduzidos comparados aos grupos que receberam DP combinada ao anabolizante (Tabela 2), ($p > 0,05$).

Tabela 2- Parâmetros biométricos e ingestão dietética em camundongos controle e aqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante.

Parâmetros	Dieta padrão		Dieta hiperlipídica/hipercalórica		
	DP	+CT20	DH/H	+CT10	+CT20
Massa corporal inicial (g)	19,79 ± 0,48 ^a	19,85 ± 0,59 ^a	20,05 ± 0,42 ^a	20,07 ± 0,49 ^a	19,93 ± 0,57 ^a
Massa corporal final (g)	28,99 ± 0,44 ^a	31,30 ± 0,36 ^b	28,89 ± 0,46 ^a	28,84 ± 0,45 ^a	29,13 ± 0,34 ^a
Ganho de massa (g/dia)	0,12 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
TEP (g/kg)	0,47 ± 0,05 ^a	0,59 ± 0,04 ^b	0,44 ± 0,05 ^a	0,44 ± 0,04 ^a	0,46 ± 0,05 ^a
Consumo de dieta (g/g massa/dia)	0,21 ± 0,06 ^a	0,30 ± 0,04 ^b	0,20 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,07 ^{a,b}	0,25 ± 0,06 ^{a,b}
Ingestão energética (kj/g massa/dia)	3,26 ± 0,22 ^a	4,66 ± 0,30 ^b	4,86 ± 0,33 ^b	5,58 ± 0,25 ^c	6,07 ± 0,41 ^c
CEA (%)	1,88 ± 0,18 ^a	1,51 ± 0,08 ^b	1,85 ± 0,16 ^a	1,59 ± 0,13 ^b	1,49 ± 0,11 ^b
IMC inicial (g/cm ²)	0,24 ± 0,008 ^a	0,24 ± 0,007 ^a	0,24 ± 0,007 ^a	0,24 ± 0,010 ^a	0,24 ± 0,007 ^a
IMC final (g/cm ²)	0,24 ± 0,007 ^a	0,24 ± 0,004 ^a	0,24 ± 0,008 ^a	0,24 ± 0,006 ^a	0,24 ± 0,009 ^a
Índice de Lee inicial	1,29 ± 0,011 ^a	1,30 ± 0,012 ^a	1,30 ± 0,009 ^a	1,31 ± 0,015 ^a	1,30 ± 0,011 ^a
Índice de Lee final	1,38 ± 0,005 ^a	1,40 ± 0,003 ^b	1,38 ± 0,011 ^a	1,39 ± 0,006 ^a	1,38 ± 0,005 ^a

Fonte: Do autor

Nota: DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipercalórica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona; TEP, taxa específica de ganho de peso; CEA, coeficiente de eficiência alimentar; IMC, índice de massa corporal. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

No período inicial do tratamento todos os animais que receberam anabolizante apresentaram maior ganho de massa. A partir da sexta semana de tratamento a massa corporal desses animais apresentou comportamento estável, exceto nos animais que receberam a DP, os quais apresentaram massa corporal final significativamente maior em relação aos demais grupos (Figura 1), $p < 0,05$.

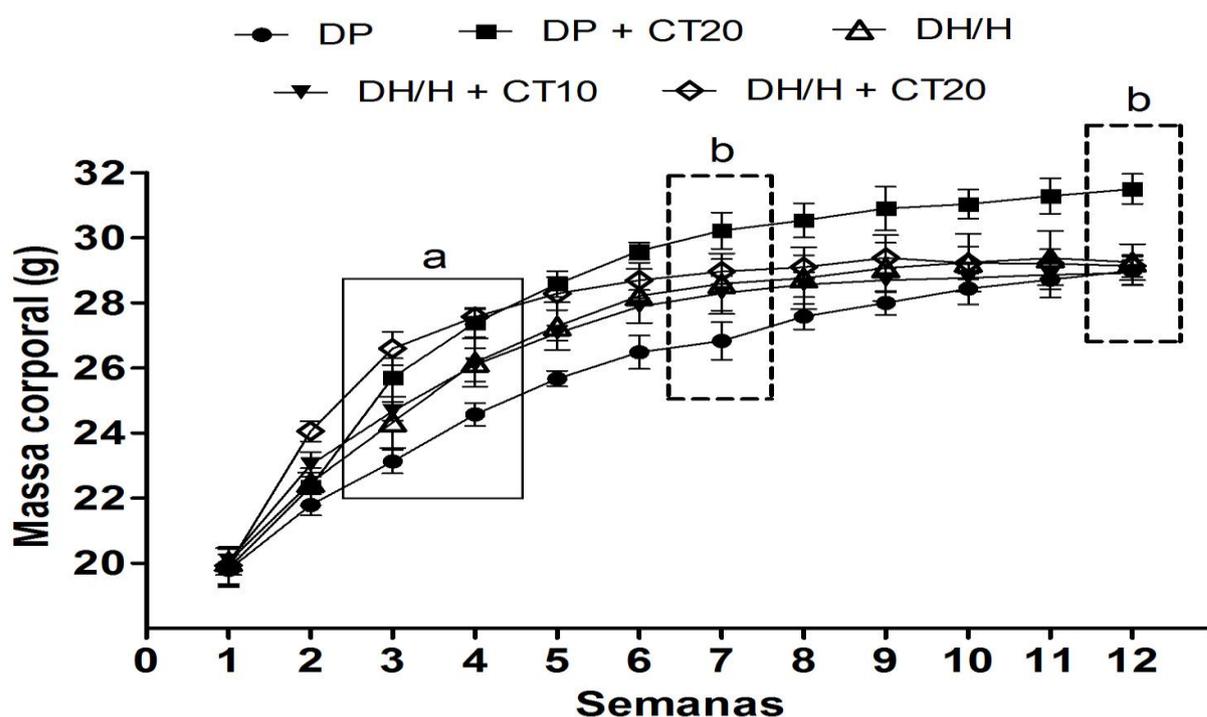


Figura 1 - Ganho de massa corporal de camundongos controle e aqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

A análise morfológica do tecido adiposo encontra-se representada na figura 2. O número e a área dos adipócitos foram semelhantes em todos os grupos investigados ($p > 0,05$).

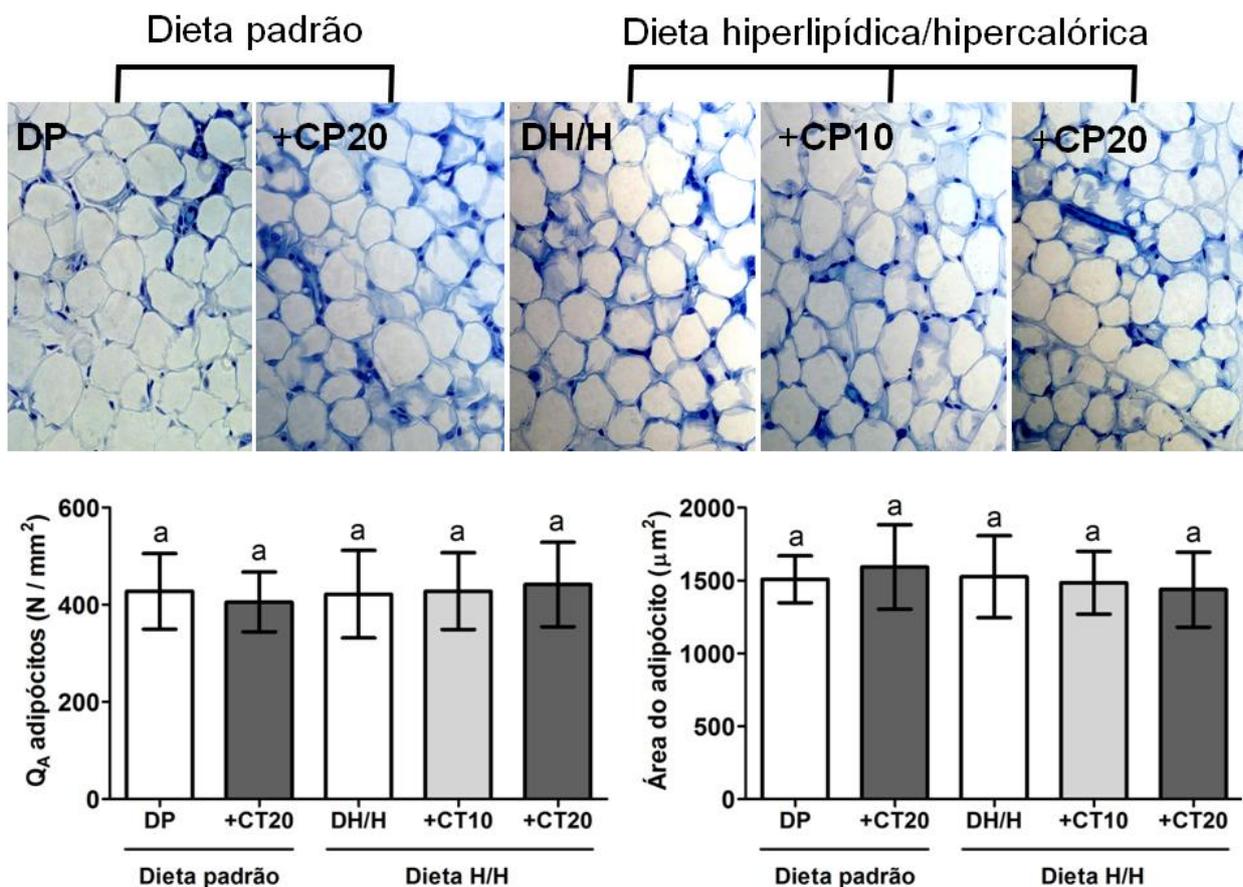


Figura 2- Densidade de número (QA) e área de adipócitos de camundongos controle e daqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

Os animais que receberam a DP isolada ou combinada com anabolizante apresentaram morfologia hepática normal, com hepatócitos organizados em cordões celulares circundados por capilares sinusoidais com lume estreito. Os grupos tratados com a DHH apresentaram esteatose microvesicular e macrovesicular, as quais foram agravadas pela administração de anabolizante de forma dose-dependente (Figura 3), ($p < 0,05$).

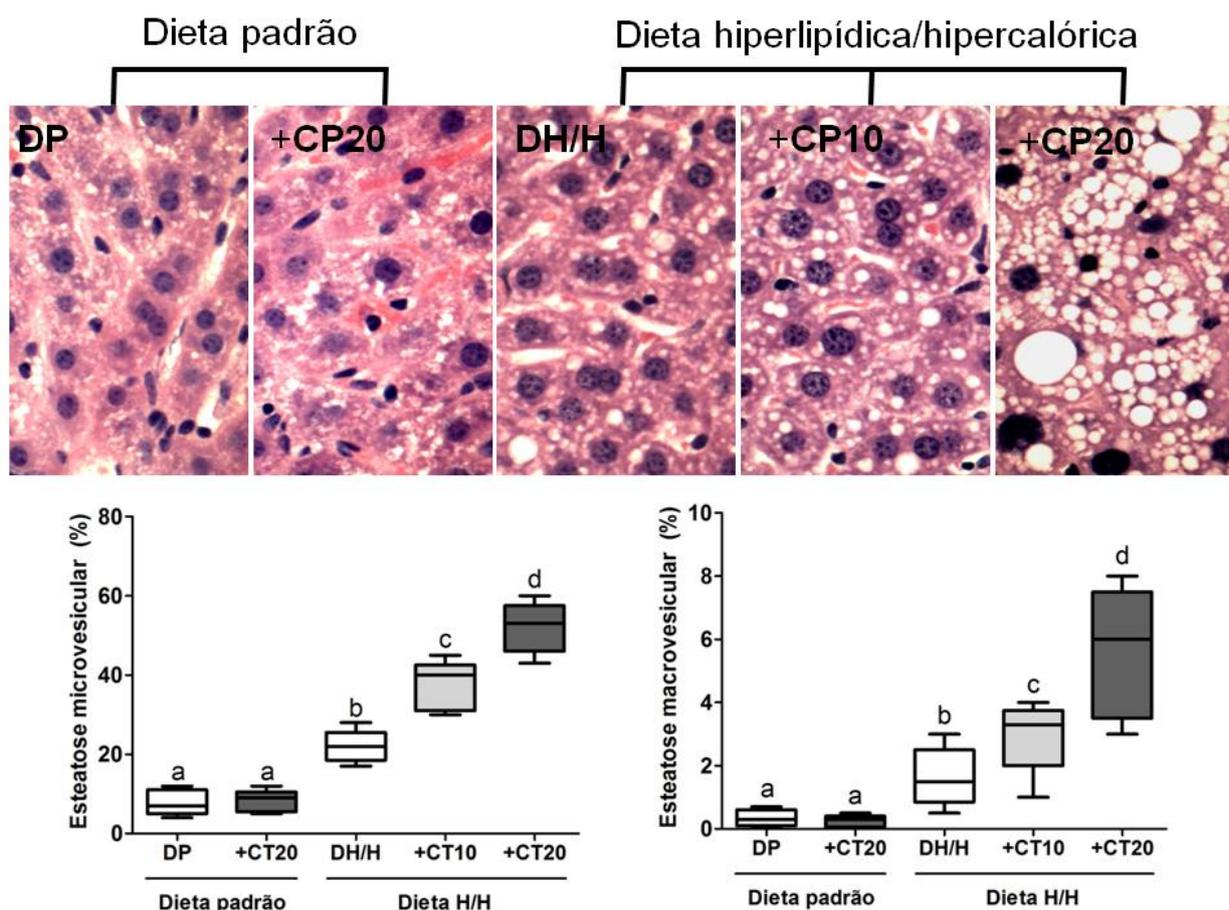


Figura 3 - Estrutura hepática e níveis de esteatose micro e macrovesicular em camundongos controle e daqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

Os animais que receberam a DP combinada com anabolizante apresentaram redução significativa dos níveis circulantes das enzimas de função hepática AST e ALT em relação ao grupo tratado apenas com a DP ($p < 0,05$). Essas enzimas foram significativamente aumentadas nos animais tratados com a DHH e a maior dose de anabolizante (20 mg/kg), $p < 0,05$. Os níveis de ALP e bilirrubina total foram semelhantes em todos os grupos investigados (Figura 4), ($p > 0,05$).

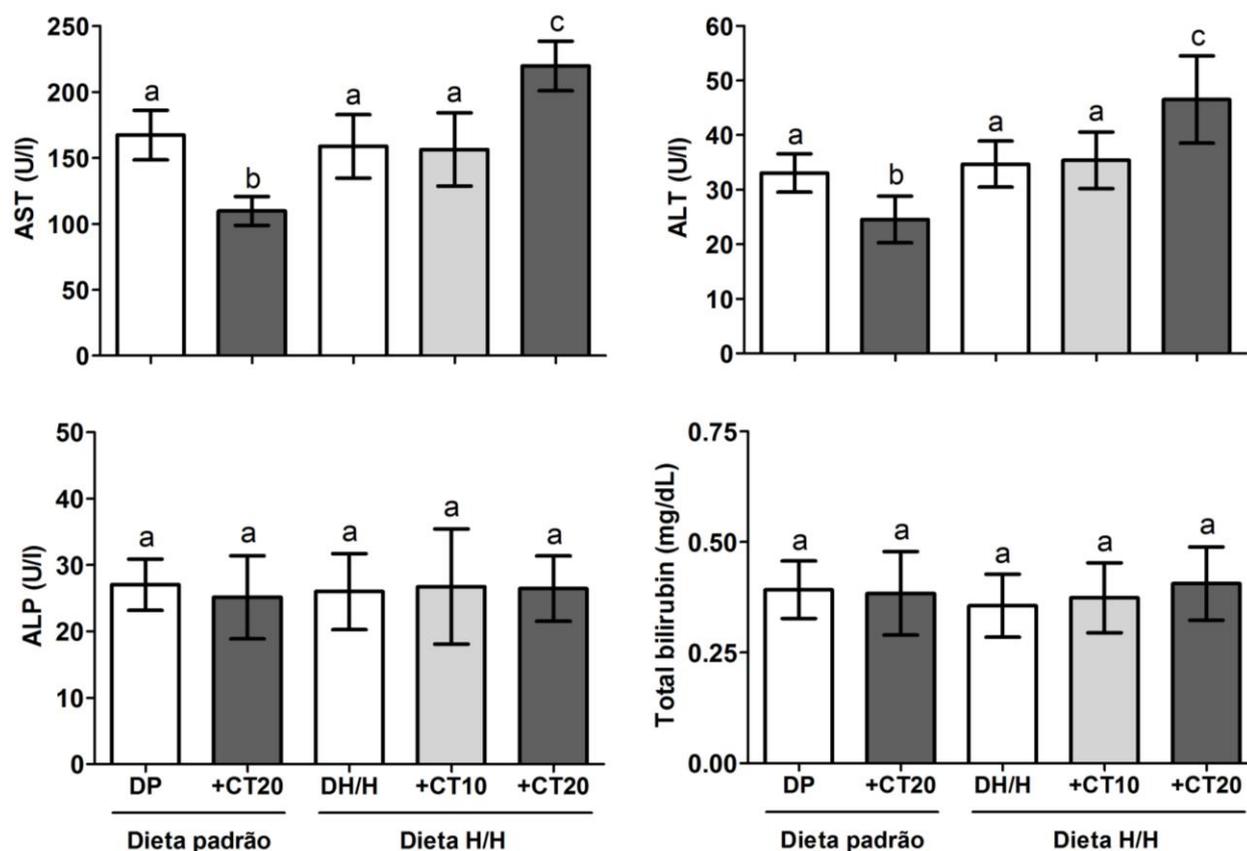


Figura 4 - Níveis plasmáticos de enzimas de função hepática e bilirrubina total em camundongos controle e daqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, fosfatase alcalina. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

Os animais tratados simultaneamente com DP e anabolizante apresentaram redução significativa dos níveis de colesterol total e LDL colesterol comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Todos os animais tratados com DHH apresentaram aumento significativo dos níveis de triglicérides em relação aos animais que receberam a DP isolada ou associada ao anabolizante ($p < 0,05$). Os animais tratados concomitantemente com DH/H e anabolizante apresentaram redução significativa do colesterol HDL em relação aos demais grupos, $p < 0,05$ (Figura 5).

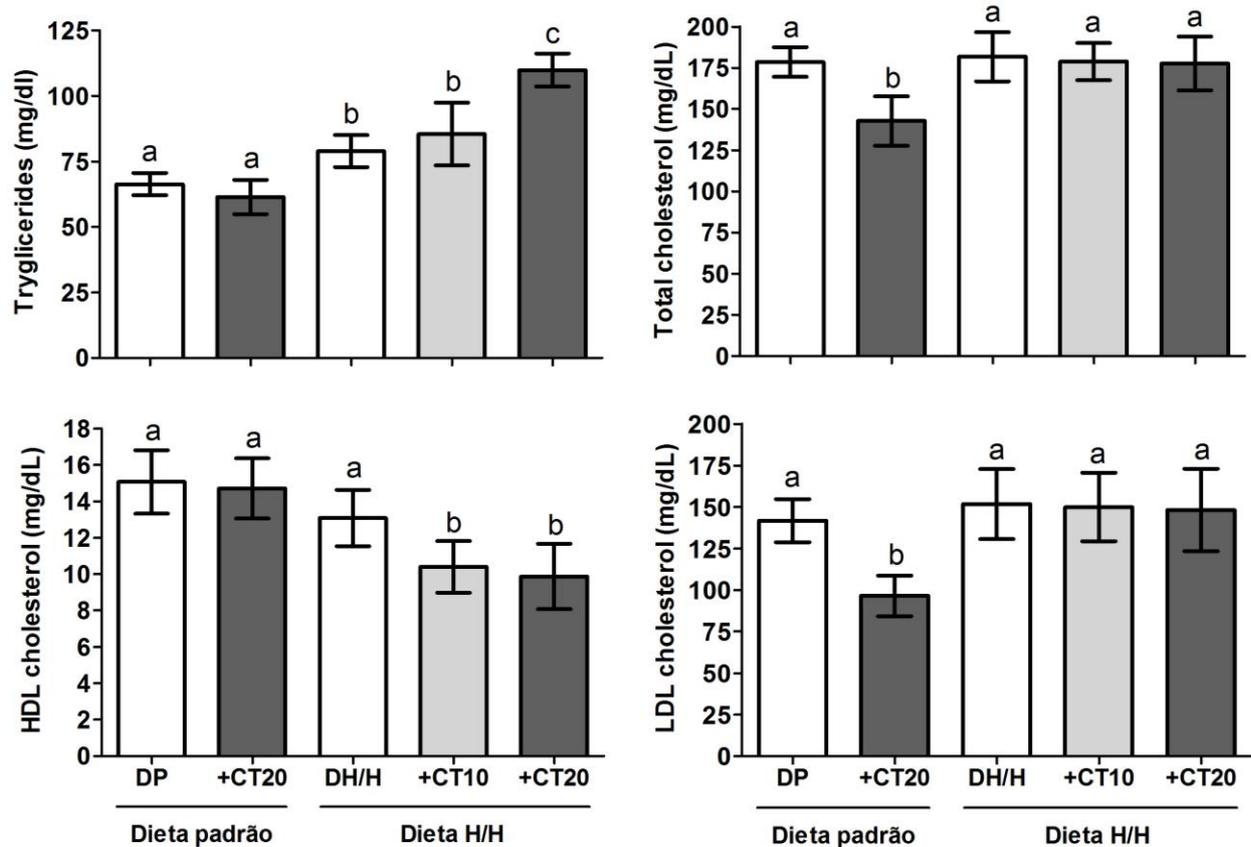


Figura 5 - Perfil lipídico plasmático de camundongos controle e aqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

A Figura 6 apresenta os níveis de citocinas no plasma de camundongos controle e aqueles tratados com a DH/H e esteroide anabolizante. Os animais tratados apenas com a DH/H apresentaram aumento significativo das citocinas IFN- γ e IL-2 e redução significativa de IL-4, IL-5 e MIP-1 α comparado ao grupo DP ($p < 0,05$). Independente da dieta, os animais tratados com esteroide anabolizante apresentaram níveis plasmáticos de citocinas significativamente menores em relação aos animais tratados apenas com DP ou DH/H ($p < 0,05$).

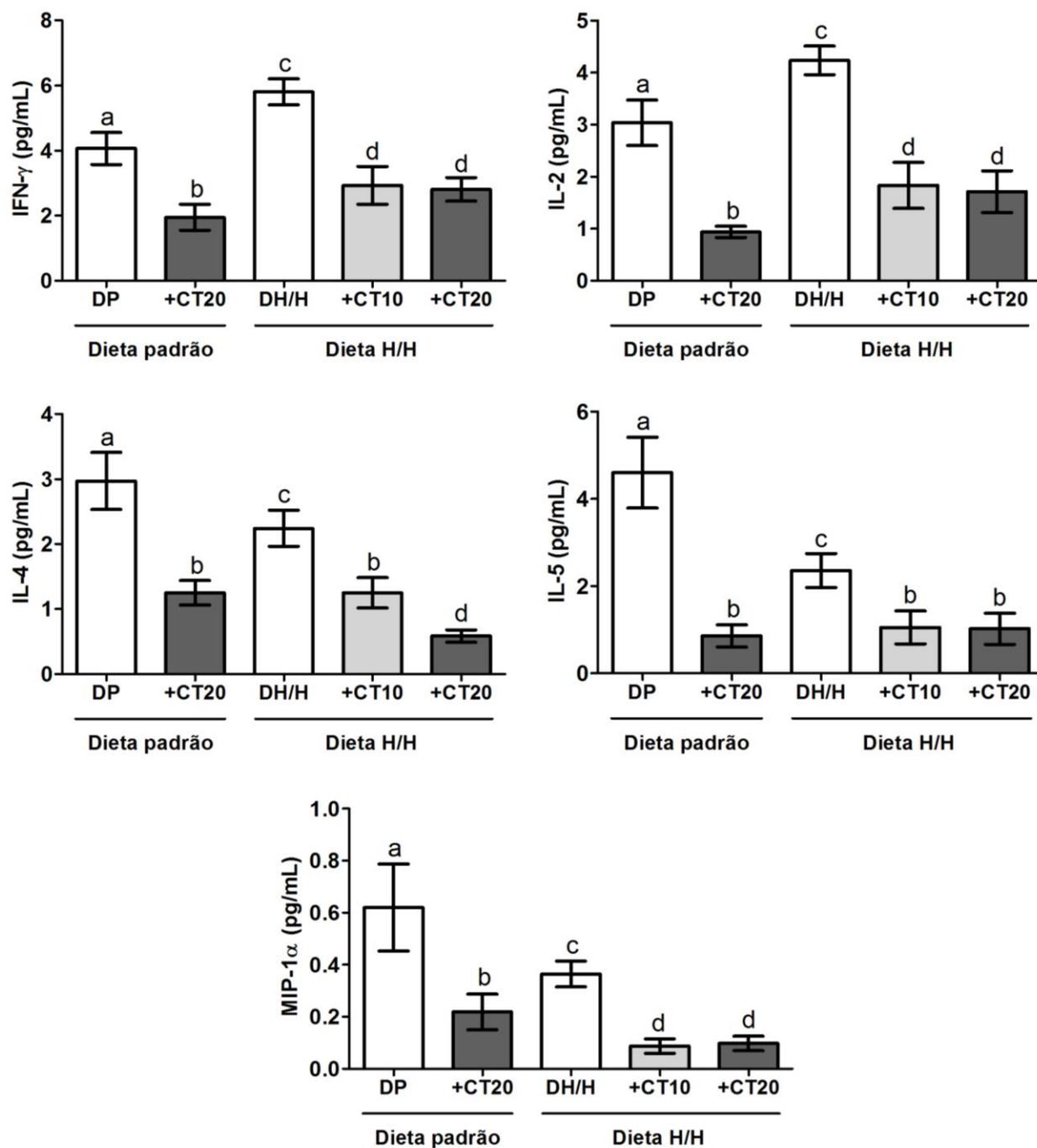


Figura 6 - Níveis de citocinas no plasma de camundongos controle e aqueles tratados com dieta hiperlipídica/hipoproteica e esteroide anabolizante. DP, dieta padrão; DH/H, dieta hiperlipídica/hipoproteica; +CT10, 10mg/kg de cipionato de testosterona; +CT20, 20mg/kg de cipionato de testosterona. a,b,c Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor

6 DISCUSSÃO

Embora o perfil de ingestão alimentar e a utilização de doses suprafisiológicas de EA possam representar fatores de risco isolados para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (NIEMINEN et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998; URHAUSEN et al., 2004) e metabólicas (GLAZER, 1991; ROSINI et al., 2012; SAMPEY et al., 2011; SCHWINGEL et al., 2011), o efeito combinado desses fatores sobre a estrutura e função de órgãos e tecidos ainda é pouco conhecido. Assim, o presente estudo investigou o impacto da administração isolada e combinada de DH/H e EA cipionato de testosterona sobre o perfil lipídico sistêmico, níveis circulantes de citocinas, estrutura e função hepática em camundongos. Os nossos achados indicaram que o EA não provocou repercussões metabólicas e morfofuncionais hepáticas deletérias em animais tratados com dieta normoproteica e normocalórica. Entretanto, o anabolizante potencializou a dislipidemia e a gravidade da esteatose hepática induzida pela DH/H ao mesmo tempo em que reduziu os níveis de citocinas circulantes.

No presente estudo, os animais tratados com dieta padrão e EA apresentaram desenvolvimento corporal mais acentuado e mais rápido ao longo de todo o período experimental. Aparentemente esses achados estão relacionados à maior ingestão de dieta e elevada eficiência alimentar, características consistentes com o efeito orexigênico e anabólico de esteroides análogos da testosterona (BRONSON et al., 1996; DARNTON et al., 1999). Existem evidências que a utilização de EA provoca modificações comportamentais associadas à estimulação sistêmica do metabolismo energético celular (EVANS 2004; GOOREN, 2009; GULLETT et al., 2010) e ao efeito direto sobre a função do sistema nervoso central (BRONSON et al., 1996; JOHANSSON et al., 2000). Assim, o aumento do apetite e da ingestão alimentar representam efeitos comportamentais típicos dos EA (DARNTON et al., 1999, GOOREN, 2009), os quais são coerentes com a necessidade de aumentar o aporte nutricional para subsidiar o anabolismo celular e o crescimento corporal (BRONSON et al., 1996; GULLETT et al., 2010; JOHANSSON et al., 2000).

Embora a dieta experimental rica em lipídios tenha apresentado elevado valor calórico, os animais tratados com essa dieta apresentaram maior crescimento corporal apenas no início do experimento (primeiras 4 semanas), com estabilização da massa corporal a partir da sexta

semana de tratamento. Ao final do experimento a massa corporal desses animais foi semelhante àquela observada para os animais tratados com DP. Tem sido demonstrado que o crescimento corporal não depende apenas do valor energética da dieta. Assim, o conteúdo de macronutrientes e micronutrientes é essencial para garantir o crescimento corporal adequado (CHRISTIAN; STEWART, 2010; PENITENTE et al., 2013). Principalmente as proteínas exercem papel fundamental no ganho de massa e crescimento corporal, de modo que a deficiência proteica representa um fator limitante isolado que prejudica o crescimento corporal de forma independente do valor energético da dieta (CHRISTIAN; STEWART, 2010; PENITENTE et al., 2013). Em estudo prévio com ratos alimentados com dieta hipoproteica e normocalórica, o crescimento corporal foi drasticamente prejudicado em relação aos animais alimentados com DP. Entretanto, a relação entre a massa dos órgãos e a massa corporal permaneceu inalterada, indicando que mesmo em condições de restrição proteica o organismo parece desviar grande parte dos aminoácidos para garantir o desenvolvimento das vísceras à custa da redução do crescimento corporal geral (PENITENTE et al., 2013).

Considerando que os animais tratados com DH/H e anabolizante apresentaram crescimento corporal semelhante ao grupo tratado apenas com DP, o conteúdo lipídico e energético da dieta não foi capaz de influenciar o efeito anabólico dos esteroides. Por outro lado, a carência proteica parece atenuar ou abolir a ação anabólica dos esteroides, prejudicando o ganho de massa corporal. Apesar das diferenças biométricas, o tratamento isolado ou combinado com dieta e anabolizante não modificaram a estrutura microscópica do tecido adiposo, o qual apresentou número e área de adipócitos semelhante. Esses resultados indicaram que o maior crescimento corporal dos animais tratados com DP e anabolizante foi independente do crescimento das células adiposas, ocorrendo provavelmente em resposta ao aumento da massa livre de gordura. Esse efeito foi esperado, uma vez que o músculo esquelético é considerado o principal tecido alvo dos efeitos anabólicos dos esteroides androgênicos (CELOTTI; CESI, 1992; EVANS, 2004; KANAYAMA et al., 2010). Além disso, como os adipócitos não foram influenciados pela DH/H, parece evidente que até mesmo o crescimento do tecido adiposo não depende apenas da ingestão lipídica, sendo influenciado pelo conteúdo proteico da dieta.

Apesar do efeito limitado sobre o crescimento corporal, a DH/H foi eficiente para induzir dislipidemia e esteatose hepática. Entretanto, não foram observadas evidências de obesidade, uma vez que os parâmetros biométricos foram semelhantes àqueles observados para os animais controle tratados com DP. Diversos modelos animais para o desenvolvimento obesidade,

dislipidemia e doença hepática gordurosa não alcoólica têm sido amplamente descritos (FAZIO; LINTON, 2001; ROSINI et al., 2012; RUSELL; PROCTOR, 2006). Em geral, os melhores modelos experimentais utilizam dietas hipercalóricas, ricas em carboidratos e/ou lipídios, componentes típicos de dietas ocidentais, as quais são frequentemente associadas ao aumento do risco para doenças metabólicas e cardiovasculares (STRANDBERG et al., 2009; ROSINI et al., 2012). Especialmente as dietas com elevado teor de lipídios têm demonstrado grande potencial para induzir dislipidemia em animais (FAZIO; LINTON, 2001; SAMPEY et al., 2011) e humanos (CERVATO et al., 1997; LICHTENSTEIN et al., 1998; OKREGLICKA, 2015). Entretanto, mesmo em animais dislipidêmicos e naqueles com doença hepática gordurosa, nem sempre ocorre a instalação de elevada adiposidade corporal e obesidade (MARCHESINI et al., 2001; POLYZOS et al., 2012), indicando que a dislipidemia e a esteatose hepática podem se manifestar como entidades mórbidas independentes de modificações do perfil biométrico. O desenvolvimento de esteatose hepática secundário à ingestão de dietas ricas em gordura é complexo e multifatorial, sendo especialmente relacionado com fatores metabólicos como a redução da síntese de leptina, deficiência na β -oxidação, produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (ex: TNF- α e IFN- γ) e danos oxidativos hepáticos (POLYZOS et al., 2012; TINIAKOS et al., 2010;). Aparentemente, diversas condições patológicas, incluindo a obesidade, diabetes melitus, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e intoxicações por xenobióticos podem induzir todas as alterações metabólicas favoráveis ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (MARCHESINI et al., 2001; POLYZOS et al., 2012).

Comportando-se como um xenobiótico, uso de EA exógenos tem sido associado com um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças hepáticas, incluindo esteatose, esteato-hepatite não alcoólica e hepatocarcinoma (LUSETTI et al., 2015; PERTUSI, 2001; SCHWINGEL et al., 2011). No presente estudo, a administração de esteroide anabolizante não modificou a estrutura hepática, mas reduziu os níveis plasmáticos de colesterol total e LDL sem alterar os níveis de HDL e triglicerídeos em animais tratados com a DP. Surpreendentemente, esses achados indicam um possível efeito sistêmico positivo do anabolizante em modular o perfil lipídico para um fenótipo não predisponente de doenças metabólicas e cardiovasculares. Dessa forma, é possível que na ausência de comorbidades e em condições nutricionais adequadas, o potencial nocivo dos EA esteja mais associado com a dose, frequência e tempo de uso do que com uma suposta toxicidade intrínseca ligada aos mecanismos de ação dessas drogas sobre os órgãos e tecidos. Por outro lado, a administração de esteroide anabolizante estimulou o

desenvolvimento da dislipidemia e a degeneração tecidual, aumentando a gravidade da esteatose hepática de forma dose dependente em animais tratados com a DH/H. Têm sido amplamente descrito que o fígado é suscetível ao desenvolvimento de esteatose frente à utilização de EA (AHMED et al., 2009; DICKERMAN et al., 1999; PERTUSI, 2001; SCHWINGEL et al., 2011). Existem evidências de que as características farmacocinéticas dos EA representam elemento preponderante para a sobrecarga e o desenvolvimento de lesões hepáticas (KICMAN, 2008; RONE, et al., 2009; SHAHIDI, 2001;). Consistindo de cadeias apolares longas e longo tempo de meia vida, a biotransformação dos EA pelo metabolismo hepático é lenta, de modo que são necessários múltiplos ciclos de passagem dos anabolizantes no fígado até que a biotransformação da molécula original tenha sido suficiente para permitir a sua completa eliminação do organismo (BÜTTNER; THIEME, 2010; SHAHIDI, 2001). Em conjunto com lento processamento metabólico, elevadas doses, frequência e duração de administração, agravam a hepatotoxicidade e aumentam a chance de desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (KANAYAMA et al, 2010; SCHWINGEL et al., 2011). Esse aspecto tem sido comprovado em estudos prévios, indicando que grande parte dos usuários não terapêuticos de EA que desenvolveram esteatose hepática utilizavam elevadas doses de anabolizantes, as quais frequentemente são 100 vezes maiores do que a concentração fisiológica da testosterona (DICKERMAN et al., 1999; SCHWINGEL et al., 2011).

Uma vez que a dislipidemia e esteatose hepática foram mais acentuadas nos animais tratados com a DH/H e anabolizante, o conteúdo lipídico da dieta parece interagir de forma complexa com o anabolizante para potencializar o dano hepático. Até o presente momento não foram encontrados estudos investigando a relação entre a composição da dieta e toxicidade hepática induzida por EA. Entretanto, sabe-se que a utilização de esteróides anabolizantes exógenos inibe a biossíntese endógena de esteróides (RONE et al., 2009; SCHWINGEL et al., 2011). Isto significa que a primeira etapa para a produção de hormônios esteróide é dificultada, e que o colesterol não é convertido em pregnenolona, o produto inicial da reação de clivagem da cadeia molecular do colesterol. Isto pode resultar em armazenamento de colesterol e, possivelmente, no desenvolvimento de um ambiente adequado para o acúmulo de gordura no fígado (RONE et al., 2009; SCHWINGEL et al., 2011). Embora não esteja comprovado, é possível inferir que a deficiência dietética de proteínas pode contribuir para agravar esse mecanismo devido à produção deficiente das enzimas envolvidas no metabolismo hepático de

substratos lipídicos, favorecendo o acúmulo dessas moléculas frente ao maior aporte nutricional a partir da DH/H.

Ainda não é bem compreendido se a DH/H aumenta o efeito hepatotóxico do esteroide anabolizante ou se essa droga aumenta o potencial da DH/H para induzir a doença hepática gordurosa não alcoólica. Embora ambas as hipóteses possam coexistir, a análise do perfil lipídico observado no presente estudo indicou que o esteroide anabolizante pode ser capaz de agravar a dislipidemia, especialmente por estimular o aumento dos níveis circulantes de triglicerídeos. Considerando que os achados do presente estudo foram consistentes com a proposição de que o desenvolvimento de dislipidemia, especialmente a hipertrigliceridemia, pode contribuir para o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (POLYZOS et al., 2012; TINIAKOS et al., 2010); a hipótese mais coerente é que, ao agravar a dislipidemia, os EA amplificam o potencial da DH/H para induzir a doença hepática gordurosa não alcoólica. Assim, os grupos tratados com DH/H e anabolizante apresentaram maiores níveis plasmáticos de triglicérides ao mesmo tempo em que desenvolveram maiores acúmulos de gotículas de gordura no fígado. Como esse achado foi dose dependente, essa proposição parece ainda mais coerente em relação ao modelo experimental investigado.

O impacto da utilização de EA no perfil lipídico tem sido foco de diversos estudos (COHEN et al., 1996; GLAZER, 1991; FONTANA et al., 2008; SCHWINGEL et al., 2011). Um estudo anterior, utilizando um modelo de camundongo transgênico (CETP^{+/+}LDLr^{-/-}) que expressa perfil lipídico semelhante à humanos, demonstrou que o tratamento com EA em animais sedentários provocou um aumento nos níveis de HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos (FONTANA et al., 2008). Entretanto, Baldo-Enzi et al., (1990) demonstrou marcante redução (38%) dos níveis circulantes de HDL e leve aumento de LDL (6%) em praticantes de musculação usuários não terapêuticos de EA comparado à indivíduos controle que nunca utilizaram anabolizantes. Em modelo experimental com ratos, APARICIO et al. (2013) também demonstrou que a administração de 10 mg/kg/semana de decanoato de nandrolona durante 12 semanas foi capaz de reduzir os níveis circulantes de HDL e triglicerídeos. Existem evidências de que os hormônios esteroides influenciam os níveis de HDL ao aumentar a expressão e atividade da lipase hepática, estimulando a lipólise e a degradação do HDL (APPLEBAUM-BOWDEN et al., 2002; BALDO-ENZI et al., 1990). Além disso, esse mecanismo tem sido associado ao aumento dos níveis de LDL, possivelmente constituindo um subproduto do catabolismo de VLDL, também mediado pela lipase hepática (TIKKANEN; NIKKILA, 1987). A

influência da testosterona no metabolismo lipídico tem sido sistematicamente descrita, especialmente em humanos com síndrome gonadal. Parece haver consenso que a reposição hormonal com análogos da testosterona é capaz de reduzir os níveis de colesterol total, LDL, HDL e triglicérides (WHITSEL et al., 2001; ZGLICZYNSKI et al., 1996). Embora a redução dos níveis de lipídios séricos pareça uma adaptação benéfica induzida pelos EA, baixos níveis de HDL têm sido associados a um maior risco de doenças metabólicas e cardiovasculares, especialmente doença hepática gordurosa não alcoólica e aterosclerose (APPLEBAUM-BOWDEN et al., 1982; GLAZER, 1991; SCHWINGEL et al., 2011).

Além de reduzir o conteúdo de lipídios no plasma e não afetar a estrutura hepática, o esteroide anabolizante também foi benéfico ao diminuir os níveis circulantes das enzimas de função hepática ALT e AST em animais tratados com a DP. Embora os animais tratados a DH/H isolada ou combinada com a menor dose de anabolizante tenham desenvolvido esteatose hepática, não houve aumento associado das transaminases no plasma. Entretanto, quando administrado na maior dose (20 mg/kg) o anabolizante aumentou os níveis dessas enzimas em animais tratados com DH/H, indicando lesão hepatocelular. Esses achados indicaram que a dosagem de transaminases plasmáticas apresentou valor diagnóstico limitado, uma vez alterações dessas enzimas foram identificadas apenas em estágios mais graves de esteatose. Dessa forma, torna-se evidente que o dano estrutural e funcional aos hepatócitos pode ser influenciado pela quantidade de lipídios acumulados no hepatócito, de modo que em estágios iniciais de esteatose o baixo conteúdo lipídico não é capaz de induzir dano celular suficiente para que ocorra translocação das transaminases para o meio extracelular. Esse aspecto parece estar relacionado com os quadros assintomáticos de esteatose hepática, que embora possa ser diagnosticada a partir da análise histopatológica de biopsia do tecido hepático, nem sempre cursa com alterações nos níveis das transaminases circulantes (MOFRAD et al., 2003; SAADEH et al., 2002; SCHWINGEL et al., 2011). De acordo com Ozer et al. (2008), as transaminases plasmáticas são consideradas altamente sensíveis e específicas como marcadores de hepatotoxicidade em animais e humanos, refletindo a intensidade das lesões morfofuncionais em hepatócitos. A dosagem de ALT e AST é frequentemente utilizada em estudos sobre a toxicidade hepática dos anabolizantes. Existem evidências de que o aumento dessas enzimas está associado ao tempo e a dose utilizada (PERTUSI, 2001; SCHWINGEL et al., 2011). Como os animais tratados com DP e anabolizante não apresentaram evidência de hepatotoxicidade, é possível que a DH/H amplifique o potencial tóxico do esteroide anabolizante e favoreça o dano hepático. Entretanto,

parece mais provável assumir que ao estimular a dislipidemia e agravar o acúmulo de lipídios nos hepatócitos, o esteroide anabolizante é capaz de favorecer, de forma dose dependente, o potencial lesivo da DH/H para induzir dano hepático morfofuncional.

Além das alterações no perfil lipídico, o tratamento com ambos, DH/H e esteroide anabolizante, promoveu marcante alteração dos níveis circulantes de citocinas. Devido a heterogeneidade na resposta ao tratamento (aumento de IFN- γ e IL-2 e redução de IL-4, IL-5 e MIP-1 α), a DH/H parece afetar a produção de citocinas de forma específica. As dietas hiperlipídicas têm sido associadas com a instalação de condições pró-inflamatórias, as quais podem ser independentes do desenvolvimento de obesidade (LEE et al., 2001, ZHOU et al., 2011). Foi previamente demonstrado que o maior aporte nutricional de lipídios modifica o metabolismo energético celular, sendo capaz de induzir resistência à insulina e processos inflamatórios crônicos de baixa intensidade (subclínicos) por meio da secreção continuada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 (BERG; SCHERER, 2005; STRANDBERG et al., 2009) e IL-1 β (DE SOUZA et al., 2005; ZHOU et al., 2011). Entretanto, a secreção de citocinas antiinflamatórias (ex: IL-1Ra e IL-10) também parece estar aumentada (STRANDBERG et al., 2009), aparentemente constituindo uma resposta contra-regulatória do organismo ao insulto pró-inflamatório determinado pelo elevado aporte lipídico. Em modelo experimental com camundongos tratados com dieta rica em gordura, também foi observada atenuação da resposta imunológica devido a redução do número e função dos leucócitos granulócitos e macrófagos, os quais foram capazes de produzir menor quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando desafiados com antigênicos bacterianos (STRANDBERG et al., 2009). Além disso, existem evidências de que linfócitos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam menor capacidade de proliferação em relação à linfócitos de animais tratados com dieta com baixo teor de lipídios (KOLLMORGEN et al., 1979). Assim, acredita-se as dietas hiperlipídicas e a obesidade podem aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças crônicas como aterosclerose e processos infecciosos, especialmente devido ao impacto negativo de condições hiperlipidêmicas sobre a função imune (STRANDBERG et al., 2009; ZHOU et al., 2011).

Embora as dietas hiperlipídicas sejam consideradas pró-inflamatórias, a elevação de IFN- γ e IL-2 observada no presente estudo parece corroborar com a hipótese de instalação de um quadro inflamatório sistêmico de baixa intensidade. Entretanto, não foram observados indícios de inflamação hepática. Tem sido descrito importante papel da resposta inflamatória na

patogênese da doença hepática gordurosa (AHMED et al., 2009; SAMPEY et al., 2011). Entretanto, estudos prévios demonstraram que a esteatose hepática (manifestação típica dessa doença) pode se desenvolver mesmo na ausência de processo inflamatório local evidente (AHMED et al., 2009). Foi previamente demonstrado que em resposta a dieta rica em colesterol, camundongos hiperlipidêmicos em função da deleção dos genes para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade ($LDLr^{-/-}$) e para a apolipoproteína E ($ApoE^{-/-}$) podem apresentar inflamação hepática grave na ausência de esteatose. Por outro lado, quando submetidos a mesma dieta, camundongos C57BL/6J selvagem desenvolvem esteatose hepática, mas não apresentam indício de hepatite (WOUTERS et al., 2008). Dessa forma, embora a esteatose e inflamação possam coexistir e interagir para agravar a lesão hepática, acredita-se que essas condições podem constituir entidades patológicas independentes (WOUTERS et al., 2008). Além do elevado conteúdo lipídico, o baixo conteúdo proteico da DH/H utilizada no presente estudo também pode explicar parcialmente as alterações do perfil de citocinas observado. Existe evidência de que os aminoácidos apresentam papel fundamental no controle da resposta imune uma vez que estão envolvidos na ativação de linfócitos T, linfócitos B, células natural killer e macrófagos; além de participar dos mecanismos controladores da expressão gênica e proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e citocinas (Li et al., 2007). Estudo prévio demonstrou que restrição proteica severa (dieta com 4% de proteínas) causa redução generalizada da massa de tecidos linfoides como baço, timo e linfonodos mesentéricos, a qual foi mais acentuada do que a redução da massa corporal (BELL et al., 1976). Nesse mesmo estudo, a redução do número de células linfoides foi mais acentuada na primeira semana de restrição proteica, com impacto negativo principalmente sobre células tronco, células T residentes e células reticuloepiteliais do timo. Konno et al. (1993) observaram que a função tímica é sensível à deficiência proteica, a qual foi capaz de induzir hipotrofia tímica, marcante redução do número de linfócitos T e da produção de anticorpos em ratos desafiados com antígenos sanguíneos de ovelha. Como a extenuação da resposta imune foi mais acentuada em animais jovens, foi proposto que condições nutricionais adequadas são necessárias para a maturação da função imunológica nos estágios iniciais da vida pós-natal bem como para a preservação dessas funções na idade adulta (KONNO et al., 1993). Dessa forma, devido a complexa interação entre os componentes dietéticos e o sistema imunológico, é possível que ambos, o excesso de lipídios e a carência proteica estejam associados com as alterações do perfil de citocinas induzidas pela DH/H, corroborando com as evidências de que dietas balanceadas são essenciais para uma função imunológica adequada.

Interessantemente, o esteroide anabolizante apresentou um efeito consistente e inespecífico, atenuando a produção de todas as citocinas investigadas. Ao impedir o aumento de IFN- γ e IL-2 em animais tratados com a DH/H, o esteroide anabolizante apresentou efeito inibitório típico de agentes antiinflamatórios. Dessa forma, embora a função das células de defesa não tenha sido investigada, o esteroide anabolizante parece inibir o potencial pró-inflamatório da DH/H. A atividade imunomoduladora dos hormônios esteroides, incluindo os androgênios tem sido amplamente demonstrada (DALAL et al., 1997; GILLIVER, 2010; HUGHES et al., 1995). Entretanto, os mecanismos moleculares precisos associados à esse efeito permanecem desconhecidos (OBENDORF; PATCHEV, 2004). Aparentemente, a atividade imunossupressora dos androgênios pode estar associada à inibição da via de sinalização celular mediada pelo fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ ou AP-1, mecanismo responsável pelo efeito antiinflamatório dos glicocorticoides (MAURER et al., 2001; OBENDORF; PATCHEV, 2004). Entretanto, a imunossupressão induzida por androgênios também pode operar por meio de vias moleculares independentes de NF- $\kappa\beta$ ou AP-1, indicando uma ação complexa que ainda precisa ser elucidada (OBENDORF; PATCHEV, 2004). Existem evidências de que linfócitos T, neutrófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos apresentam receptores para hormônios androgênicos, além de expressar a proteína 5 α -reductase, enzima fundamental na biotransformação da testosterona em seu derivado mais ativo, a diidrotestosterona (GILLIVER, 2010; OBENDORF; PATCHEV, 2004;). Foi demonstrado *in vitro* que os androgênios são capazes de reduzir a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-5 e aumentar a síntese de IL-10 em células T. Devido a redução da razão IFN- γ /IL-10 *in vitro* e *in vivo*, foi proposto que os androgênios poderiam estimular o perfil de resposta imune Th2, em detrimento da resposta Th1 (BEBE et al., 1999; OBENDORF & PATCHEV, 2004). Entretanto, o estímulo à produção de IL-10 parece estar associado ao tipo de esteroide utilizado, uma vez que os EA decanoato de nandrolona e oximetenolona não interferiram na síntese dessa citocina em modelo murino tratado com doses suprafisiológicas de anabolizantes (HUGHES et al., 1995). Além disso, a inibição da produção e citocinas de padrão Th2 e da resposta imune humoral também foram descritas em estudos prévios (DALAL et al., 1997, OBENDORF; PATCHEV, 2004), indicando que a imunossupressão mediada por androgênios parece ser inespecífica. Uma vez que linfócitos B não expressam receptores para androgênios, a atenuação da resposta humoral parece ser secundária a inibição da síntese de IL-6 por monócitos e macrófagos, células que reconhecidamente expressam receptores para androgênios. Assim, os monócitos e macrófagos poderiam amplificar

o efeito da testosterona para modular, de forma indireta, a resposta imunológica (OBENDORF; PATCHEV, 2004).

7 CONCLUSÃO

Considerados em conjunto, os resultados permitiram concluir que o perfil dietético é capaz de interagir de forma complexa com o esteroide anabolizante cipionato de testosterona, modificando as características de susceptibilidade e resistência ao dano morfofuncional hepático e metabólico sistêmico em camundongos. Quando administrado em animais alimentados com a dieta padrão, o EA não induziu alterações morfofuncionais hepáticas e metabólicas deletérias. Ao contrário, o anabolizante foi benéfico ao reduzir os níveis circulantes de LDL colesterol e das enzimas de função hepática nesses animais. Em combinação com a DHH, o EA agravou a dislipidemia, reduzindo os níveis circulantes de HDL colesterol, aumentando os níveis de triglicérides e a gravidade da esteatose hepática em camundongos. Embora ambos, DHH e EA tenham exercido um efeito modulador sobre os níveis circulantes de citocinas, a DHH parece influenciar diferencialmente essas moléculas, enquanto o EA apresentou ação inibitória inespecífica ao reduzir de forma generalizada os níveis circulantes das mesmas.

REFERÊNCIAS

AHMED, U.; REDGRAVE, T. G.; OATES, P. S. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 24, n. 8, p. 1463-1471, 2009.

AOAC, **Association of Official Analytical Chemists Official methods of analysis.** Washington, D.C., 1998.

APARICIO, V. A. et al.. Effects of the dietary amount and source of protein, resistance training and anabolic-androgenic steroids on body weight and lipid profile of rats. **Nutr Hosp.** v. 28, n. 1, p. 127-136, 2013.

APPLEBAUM-BOWDEN, D.; HAFFNER, S. M.; HAZZARD, W. R. The dyslipoproteinemia of anabolic steroid therapy: Increase in hepatic triglyceride lipase precedes the decrease in high density lipoprotein, cholesterol. **Metabolism.** v. 3, n. 1, p. 1147- 1152, 1982.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. Statistical methods in medical research. **Oxford: Blackwell Science.** 3^a ed., 1994.

BAGGISH, A. L. et al. Long term anabolic-androgenic steroid use is associated with left ventricular dysfunction. **Circ Heart Fail.** v. 3, n. 4, p. 472-476, 2010.

BALDO-ENZI, G. et al. Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self administration of anabolic steroids. **Metabolism.** v. 39, n. 2, p. 203-208, 1990.

BEBO, B. F. JR. et al. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. **J Immunol.** v. 162, n. 1, p. 35-40, 1999.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A.; PRICE, P. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. **Clin Exp Immunol.** v. 26, n. 2, p. 314-326, 1976.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res.** v. 96, p. 939-949, 2005.

BOULLART, A. C. I.; DE GRAAF, J.; STALENHOF, A. F. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. **Biochim Biophys Acta.** v. 1821, p. 867-875, 2012.

BRONSON, F. H., NGUYEN, K. Q., DE LA ROSA, J. Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. **Physiology & Behavior.** v. 59, n. 1, p. 49-55, 1996.

BURTON-F B.; SCHNEEMAN, B. O. Lipid infused into the duodenum of rats at varied rates influences food intake and body weight gain. **J Nutr.** v. 126, n. 11, p. 2934-2939, 1996.

BÜTTNER, A.; THIEME, D. Side Effects of anabolic androgenic steroids: pathological findings and structure-activity relationships. **Handb Exp Pharmacol.** v. 195, p. 459-84, 2010.

CARSON, P. et al. Liver enzymes and lipid levels in patients with lipodermatosclerosis and venous ulcers treated with a prototypic anabolic steroid (stanozolol): a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Int J Lower Extremity Wound.** v. 14, n. 1, p. 11-18, 2015.

CATTA-PRETA, M. et al. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch.** v. 459, p. 477-85, 2011.

CAMPBELL, J. A. Method for determination of PER and NPR. In: FOOD and nutrition board. Committee on Protein Quality. **Evaluation of Protein Quality.** p. 31-32, 1963.

CARPENTER, K. J. The concept of an “appetite quotient” for the interpretation of ad libitum feeding experiments, **J. Nutr.** v. 51, p. 435-440, 1953.

CATTA-PRETA, M.; MENDONCA, L. S.; FRAULOB-AQUINO, J. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch.** v. 459, p. 477-485, 2011.

CELOTTI, F.; CESI, P. N. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscle, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 43, n. 5, p. 469-77, 1992.

CERVATO A. M. et al. Habitual diet and cardiovascular disease risk factors. **Rev Saúde Pública** v. 31, p. 227-235, 1997.

COHEN, J. C.; FABER, W. M.; BENADE, A. Altered serum lipoprotein profile in male and female power lifters ingesting anabolic steroids. **Phys Sport med.** v. 14, p. 131-136, 1986.

CREUTZBERG, E. C. et al. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Chest Chicago.** v. 124, n. 5, p. 1733-42, 2003.

CHRISTAN, P., STEWART, C. P. Maternal micronutrient deficiency, fetal development, and the risk of chronic disease. **J Nutr.** v. 140, p. 437-445, 2010.

DALAL, M.; KIM, S.; VOSKUHL, R. R. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. **J Immunol.** v. 159, n. 1, p. 3-6, 1997.

DAMANI, S. B.; TOPOL, E. J. Emerging genomic applications in coronary artery disease. **JACC Interv.** v. 4, p. 473-482, 2011.

DARNTON, S. J. et al. The use of an anabolic steroid (nandrolone decanoate) to improve nutritional status after esophageal resection for carcinoma. **Dis Esophagus**. v. 12, n. 4, p. 283-8, 1999.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. v. 146, n. 10, p. 4192-9, 2005.

DICKERMAN, R. D. et al. Anabolic steroid-induced hepatotoxicity: is it overstated? **Clin J Sport Med**. v. 9, n. 1, p. 34-9, 1999.

EBAL, E.; CAVALIE, H.; MICHAUX, O. Effect of a lipid-enriched diet on body composition and some regulatory hormones of food intake in growing rats. **Ann Endocrinol**. v. 68, n. 5, p. 366-71, 2007.

EBENBICHLER, C. F. et al. Flow mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. **Atherosclerosis**. v. 158, n. 2, p. 483-90, 2001.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **Am J Sports Med**. v. 32, n. 2, p. 534-42, 2004.

FAZIO, S.; LINTON, M. F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front Biosci**. v. 6, p. 515-525, 2001.

FERNANDES-SANTOS, C. et al. Quantitative morphology update: image analysis. **Int J Morphol**. v. 31, p. 23-30, 2013.

FINESCHI, V. V. et al. Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic findings in two fatal cases of bodybuilders. **Int J Legal Med**. v. 121, n. 1, p. 48-53, 2007.

FONTANA, K. et al. Adverse effect of the anabolic-androgenic steroid mesterolone on cardiac remodeling and lipoprotein profile is attenuated by aerobic exercise training. **Int J Exp Pathol.** v. 89, n. 5, p. 358-366, 2008.

GASTALDELLI, A. et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Gastroenterology.** v. 133, p. 496-506, 2007.

GENTRY, R. et al. Androgenic control of food intake and body weight in male rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology.** v. 90, n. 1, p. 18-25, 1976.

GILLIVER, S. C. Sex steroids as inflammatory regulators. **J. Steroid Biochem Mol Biol.** v. 120, p. 105-115, 2010.

GLAZER, G. Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. A literature review. **Arch Intern Med.** v. 151, p. 25-33, 1991.

GOOREN, L. J. Advances in testosterone replacement therapy. **Front Horm Res.** v. 37, p. 32-51, 2009.

GULLETT, N. P.; HEBBAR, G.; ZIEGLER, T. R. Update on clinical trials of growth factors and anabolic steroids in cachexia and wasting. **Am J Clin Nutr.** v. 91, n. 4, p. 1143-1147, 2010.

HAMAGUCHI, M.; KOJIMA, T.; TAKEDA, N. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Int Med** v. 143, p. 722-728, 2005.

HAKANSSON, A. et al. Anabolic androgenic steroids in the general population: user characteristics and associations with substance use. **Eur Addict Res.** v. 18, p. 83-90, 2012.

HUGHES, T. K. et al. Modulation of immune responses by anabolic androgenic steroids. **Int J Immunopharmacol.** v. 17, n. 11, p. 857-63, 1995.

JOHANSSON, P. et al. The effect on opioid peptides in the rat brain, after chronic treatment with the anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate. **Brain Res Bull.** v. 51, n. 5, p. 413-418, 2000.

KAM, P. C.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. **Anaesthesia.** v. 60, n. 7, p. 85-92, 2005.

KANAYAMA, G., HUDSON, J. I., POPE JR, H. G. Illicit anabolic-androgenic steroid use. **Horm Behav.** v. 58, p. 11-21, 2010.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology.** v. 154, p. 502-521, 2008.

KINDLUNDH, A. M. et al. Adolescent use of anabolic-androgenic steroids and relations to self-reports of social, personality and health aspects. **Eur J Public Health** v. 11, p. 322–328, 2001.

KOLLMORGEN, G. M. et al. Inhibition of lymphocyte function in rats fed higher-fat diets. **Cancer Res.** v. 39, n. 9, p. 3458-3462, 1979.

KUHN, C. M. Anabolic Steroids. **Recent Progr Horm Res.** v. 57, p. 411-434, 2002.

LEE, Y. S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes.** v. 60, p. 2474-248, 2001.

LIA, P. et al. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition.** v. 98, n. 2, p. 237-252, 2007.

LICHTENSTEIN, A. H. et al. Dietary fat consumption and health. **Nutr Rev.** v. 56, n. 5, p. 3-19, 1998.

LING, B. L. et al. Short and long-term impact of lipectomy on expression profile of hepatic anabolic genes in rats: a high fat and high cholesterol diet-induced. **Obese model.** v. 9, n. 9, 2014.

LUSETTI, M. et al. Pathological changes in anabolic androgenic steroid users. **Journal of Forensic and Legal Medicine.** v. 33, p. 101-104, 2015.

MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes.** v. 50, n. 8, p. 1844-50, 2001.

MAURER, M. et al. Differential gene expression profile of glucocorticoids, testosterone, and dehydroepiandrosterone in human cells. **Horm. Metab. Res.** v. 33, n. 69, 2001.

MOFRAD, P. et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology.** v. 37, n. 6, p. 1286-92, 2003.

NIEMINEN, M. S. et al. Serious cardiovascular side effects of large doses of anabolic steroids in weight lifters. **Eur Heart J.** v. 17, n. 10, p. 76-83, 1996.

NOTO, A. R. et al. Drugs and health in the Brazilian press: an analysis of articles published in newspapers and magazines. **Caderno de Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2003.

NOVAES, R. D. et al. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. **Toxicol Pathol** v. 40, p. 62-70, 2012.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovasc Pathol.** v. 22, n. 4, p. 270-279, 2013.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim.** v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

OBENDORF, M.; PATCHEV, V. K. Interactions of sex steroids with mechanisms of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** v. 3, n. 4, p. 425-33, 2004.

OKRĘGLICKA, K. Health effects of changes in the structure of dietary macronutrients intake in western societies. **Rocz Panstw Zakl Hig.** v. 66, n. 2, p. 97-105, 2015.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology,** v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PENITENTE, A. R. et al. Protein restriction after weaning modifies the calcium kinetics and induces cardiomyocyte contractile dysfunction in rats. **Cells Tissues Organs.** v. 198, n. 4, p. 311-317, 2013.

PERTUSI, R. Evaluation of aminotransferase elevation in bodybuilders using anabolic steroids: hepatitis or rhabdomyolysis? **J Am Osteopath Assoc.** v. 101, n. 7, p. 391-394, 2001.

PITTS, G. C. et al. Effects of weightlessness on body composition in the rat. **Am J Physiol.** v. 244, n. 3, p. 332-337, 1983.

POLYZOS, S. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. **J Clin Gastroenterol.** v. 46, p. 272-84, 2012.

RONE, M. B.; FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. **Biochim Biophys Acta**. v. 1791, n. 7, p. 46-58, 2009.

ROSINI, T. C; SILVA, A. S. R.; MORAES C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Rev Assoc Med Bras**. v. 58, p. 383-387, 2012.

RUSELL, J. C.; PROCTOR, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovasc Pathol**. v. 15, p. 318-330, 2006.

RUSKIN, J. www.pensador.uol.com.br. 1819.

SAADEH, S. et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**. v. 123, n. 3, p. 745-50, 2002.

SAGOE, D. et al. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Ann Epidemiol**. v. 24, n. 5, p. 383-398, 2014.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**. v. 19, p. 1109-1117, 2011.

SCHREYER, S. A. et al. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 282, p. 207-214, 2002.

SCHWENK, R. W.; VOGEL, H.; SCHURMANN, A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Mol Metab**. v. 2, p. 337-347, 2013.

SCHWINGEL, P. A. et al. Anabolic-androgenic steroids: a possible new risk factor of toxicant-associated fatty liver disease. **Liver International**, v. 31, n. 3, p. 48-53, 2011.

SHAHIDI, N.T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clin Ther.** v. 23, n. 9, p. 1355-1390, 2001.

SIDNEY, S. et al. The "heart disease and stroke statistics -- 2013 update" and the need for a national cardiovascular surveillance system. **National Forum for Heart Disease and Stroke Prevention. Circulation.** v. 1, n. 127, p. 21-23, 2013.

STRANDBERG, L. et al. Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. **PLoS One.** v. 4, n. 10, p. 7605, 2009.

SULLIVAN, M. L. et al. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Prog Cardiovasc Dis.** v. 41, p. 1-15, 1998.

TAGARAKIS, C. V. et al. Testosterone propionate impairs the response of the cardiac capillary bed to exercise. **Med Sci Sport and Exerc** v. 32, n. 5, p. 946-53, 2000.

TINIAKOS, D. G., VOS, M. B., BRUNT, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. **Annu Rev Pathol Mech.** v. 5, p. 145-71, 2010.

TIKKANEN, M. J.; NIKKILA, E. A. Regulation of hepatic lipase and serum lipoproteins by sex steroids. **Am Heart J.** v. 13, n. 1, p. 562-573, 1987.

URHAUSEN, A.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? **Heart.** v. 90, n. 5, p. 496-501, 2004.

WHITSEL, E. A. et al. Intramuscular testosterone esters and plasma lipids in hypogonadal men: a meta-analysis. **Am J Med Sep.** v. 111, n. 4, p. 261-269, 2001.

WOODIWISS, A. J. et al. Effects of androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. **J Appl Physiol.** v. 88, n. 2, p. 409-415, 2000.

ZGLICZYNSKI, S. et al. Effect of testosterone replacement therapy on lipids and lipoproteins in hypogonadal and elderly men. **Atherosclerosis.** v. 121, n. 1, p. 35-43, 1996.

ZHOU, Q.; LEEMAN, S. E.; AMAR, S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 108, n. 7, p. 2867-72, 2001.