

VINÍCIUS AUGUSTO SIMÃO

**ANÁLISE HORMONAL, IMUNOLOCALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES
DE ANDRÓGENOS (AR) E ESTRÓGENOS (ER- α E ER- β) EM OVÁRIO E ÚTERO DE
RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE DECANOATO DE NANDROLONA:
avaliação nos períodos pós-tratamento e pós-recuperação**

ASSIS

2016

VINÍCIUS AUGUSTO SIMÃO

**ANÁLISE HORMONAL, IMUNOLOCALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES
DE ANDRÓGENOS (AR) E ESTRÓGENOS (ER- α E ER- β) EM OVÁRIO E ÚTERO DE
RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE DECANOATO DE NANDROLONA:
avaliação nos períodos pós-tratamento e pós-recuperação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador (a): Dr^a Isabel Cristina Cherici Camargo.

Co-Orientador (a): Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa.

ASSIS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

S588a Simão, Vinícius Augusto
Análise hormonal, imunolocalização e quantificação dos receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ER- α e ER- β) em ovário e útero de ratas submetidas a diferentes doses de decanoato de nandrolona: avaliação nos períodos pós-tratamento e pós-recuperação / Vinícius Augusto Simão. Assis, 2016.
119 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Dr^a Isabel Cristina Cherici Camargo
Co-Orientador: Dr Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

1. Esteroides. 2. Ovários - Histopatologia. 3. Imuno-histoquímica. 4. Hormônios sexuais. 5. Relação dose-resposta. I. Título.

CDD 574.192

Dedicatória

Nada do que eu teria alcançado existiria se não fosse antes a dedicação que eles sempre tiveram à minha educação, por isso, e por todo amor, esperança e confiança que sempre depositaram em mim, dedico esta conquista a meus pais, os grandes responsáveis pelo que sou e pretendo ser.

A minha companheira das horas boas e ruins, Agatha, meu muito obrigado por sempre me incentivar e apoiar, você foi fundamental para esta obra.

Agradecimentos

À minha orientadora Dr^a Isabel C. C. Camargo por toda dedicação, paciência e prazer ao transferir pra mim parte de seu vasto conhecimento, apenas dizer que me sinto honrado de ter sido seu orientado desde a iniciação científica é pouco perante o que de fato isso significa, meu eterno agradecimento pela oportunidade.

Aos meus pais, José Simão e Vanda do Carmo pela fé depositada, por sempre acreditarem em mim sobre todas as coisas, por sempre estarem próximos em me ajudar.

As minhas irmãs Jéssica e Rafaela Simão, por verem em mim um grande potencial e por serem sempre tão legais.

À minha namorada Agatha Teixeira, por ser minha companhia amada, meu ponto de equilíbrio, fonte de atenção e carinho. Por estar presente ao meu lado e ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

À Larissa Belardin pela amizade sincera, resistente a distancias, pelas risadas, descontrações, pela imprescindível parceria laboratorial na execução do trabalho e pelas discussões acadêmicas.

Ao Gabriel Leite pela amizade de anos, pelos conselhos e papos acadêmicos e por me ajudar na estadia dos períodos passados por mim em Botucatu.

À Fernanda Rosa, pela amizade alegre, sincera e companheira, tanto nas atividades acadêmicas, quanto nas mais descontraídas.

Ao Daniel Rocha e a Gabriela Lavorini pela amizade especial e o companheirismo, pelo ombro amigo de todos os momentos e por todo incentivo dado a mim ao longo do mestrado.

Ao Hugo Digmayer e o Eric Iguti pela paciência em meus momentos de estresse, pela amizade construída e por me propiciarem refúgios do mundo acadêmico com a qualidade que só eles oferecem.

Ao Nicácio Neto e Gabriela Sterle pela amizade desde a graduação, descontração e pela companhia nessa etapa acadêmica.

À Bianca Ribeiro e ao Guilherme Boleta pela simpatia e amizade construída em meio a convivência no laboratório, especificamente à Bianca, agradeço também a parceria didática no ministério das aulas práticas do estágio docência.

Ao Dr. Luis Gustavo A. Chuffa pela inspiração, por me disponibilizar o laboratório, pela orientação nas novas atividades desenvolvidas para o mestrado, por toda dedicação e conhecimento ímpar passado.

Ao LABHEM de Assis e ao Laboratório de Biologia da Reprodução de Botucatu pelo espaço altamente qualificado me disponibilizado na execução das análises do projeto de mestrado e pela equipe dedicada no oferecimento de instruções e treinamento.

Ao Dr. João Tadeu R. Paes por sua simpatia e disponibilidade em oferecer as receitas médicas necessárias à aquisição dos anabolizantes e pela oportunidade de me dar prosseguimento à carreira acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências pela oportunidade e disponibilidade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e servidores técnicos do Departamento de Ciências Biológicas, pelos esclarecimentos, prontidão e competência.

Aos animais experimentais, com todo o respeito e consideração por suas vidas, sem os quais nada seria possível.

À FAPESP e a Capes pelo apoio financeiro na forma de auxílio pesquisa para aquisição dos materiais necessários à execução do projeto e pelas bolsas de estudo ao longo da iniciação científica e do mestrado.

E por fim, aos Professores por aceitarem prontamente meu convite para composição das Bancas de Qualificação e de Defesa de Dissertação, sinto-me honrado.

*“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”*

– George Bernard Shaw

SIMÃO, Vinícius Augusto. **ANÁLISE HORMONAL, IMUNOLocalização E QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANDRÓGENOS (AR) E ESTRÓGENOS (ER-A E ER-B) EM OVÁRIO E ÚTERO DE RATAS SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE DECANOATO DE NANDROLONA: avaliação nos períodos pós-tratamento e pós-recuperação.** 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

RESUMO

Embora sejam extensas as opções de aplicação terapêutica dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA), é crescente na sociedade o uso destas drogas por razões estéticas e este consumo tem aumentado principalmente entre as mulheres nas últimas décadas. É amplamente relatado que os EAA comprometem a saúde e promovem efeitos adversos na reprodução, no entanto, pouca atenção é dada a respeito dos efeitos promovidos pelos EAA no ciclo estral, na morfologia ovariana e uterina e na regulação da função ovariana após os períodos de tratamento e de recuperação. Nenhum relato foi obtido na literatura, quanto à administração de diferentes doses de EAA e a possibilidade de reversibilidade dos efeitos colaterais. Assim, o objetivo do projeto é avaliar o efeito de diferentes doses do esteroide decanoato de nandrolona (DN) no ciclo estral e nos ovários e útero de ratas albinas com ênfase no controle da imunexpressão do AR, ERs, CYP450 aromatase e Inibina-A do tecido ovariano e nos níveis hormonais sexuais, e também se há recuperação dos prejuízos reprodutivos após a interrupção do tratamento esteroideal. Ratas Wistar foram tratadas com DN nas doses de 1,87, 3,75, 7,5 e 15 mg/kg ou óleo mineral (grupos controle) por 15 dias via subcutânea. Os animais foram divididos em três procedimentos: (a) tratamento durante 15 dias; (b) tratamento seguido por recuperação de 30 dias; (c) tratamento seguido por recuperação de 60 dias. O ciclo estral foi monitorado diariamente e no final de cada período os animais foram sacrificados. Durante o período de tratamento com DN e no pós-recuperação de 30 dias, os animais exibiram diestro persistente, que manteve-se somente no grupo de 15 mg DN/kg no período de recuperação de 60 dias. O peso ovariano foi reduzido e o uterino aumentado na comparação com o controle em função do tratamento com DN e somente foi recuperado no 60 dias pós-tratamento nos grupos que restabeleceram o ciclo estral. Houve uma redução ($p < 0,05$) no número de corpos lúteos, folículos antrais e em crescimento e diminuição da camada endometrial uterina, em contraste com um aumento ($p < 0,05$) nos folículos atrésicos e das camadas do miométrio e perimétrio nas ratas DN de maneira dose e período-dependente. Alterações histopatológicas notáveis ocorreram nos ovários e útero de todos os grupos tratados com DN em função do período avaliado e estiveram relacionados aos níveis dos hormônios sexuais e de expressão dos receptores ovarianos alterados de maneira dose-específica. Concluiu-se que o tratamento experimental com DN promoveu toxicidade ovariana e uterina em ratas de maneira dose-dependente e que o período de recuperação de 60 dias foi suficiente para a reversibilidade dos efeitos colaterais apenas no tratamento com as menores doses do esteroide, de forma que os níveis hormonais e de expressão dos receptores ovarianos puderam se recuperar após marcante desregulação promovida pelo tratamento androgênico.

Palavras-chave: Decanoato de Nandrolona. Ovários. Útero. Histopatologia. Imunoexpressão. Dosagem hormonal. Recuperação pós-tratamento. Ratas.

SIMÃO, Vinícius Augusto. **HORMONAL ANALYSIS, IMMUNOLOCALIZATION AND QUANTIFICATION OF ANDROGEN RECEPTOR (AR) AND ESTROGENS (ER-A AND ER-B) IN THE OVARY AND UTERUS OF RATS SUBJECTED TO DIFFERENT DOSES OF NANDROLONE DECANOATE: evaluation in the post-treatment and post-recovery periods.** 2016. 119 f. Dissertation (Master in Biosciences). - Faculty of Science and Letters, Univ Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Assis, 2016.

ABSTRACT

Although are extensive the options of therapeutic use of anabolic-androgenic steroids (AAS), the use of these drugs for aesthetic reasons is growing in society and this consumption has increased mainly among women in recent decades. It is widely reported that the AAS compromise the health and promote adverse effects on reproduction, however, little attention is given on the effects promoted by the AAS in the estrous cycle, in ovarian and uterine morphology and in the regulation of ovarian function after treatment periods and recovery. No report has been obtained from the literature regarding the administration of different doses of synthetic steroids and the possibility of reversibility of side effects. The objective of this project is to evaluate the effect of different doses of steroid nandrolone decanoate (ND) in the estrous cycle and ovaries and uterus of albino rats with emphasis on control of AR immunoexpression, ERs, CYP450 aromatase and inhibin-A in the ovarian tissue and sexual hormone levels, and evaluate if there is recovery of possible reproductive damages after cessation of steroid treatment. Female Wistar rats were treated with ND at doses of 1.87, 3.75, 7.5 and 15 mg/kg or received mineral oil (control groups estrus and diestrus) for 15 days subcutaneously. The animals were divided into three procedures: (a) treatment for 15 days; (b) treatment followed by recovery to 30 days; (c) treatment followed by recovery for 60 days. The estrous cycle was monitored daily and at the end of each period the animals were sacrificed. During the ND treatment period and after recovery for 30 days, all animals exhibited persistent diestrus, which was maintained only in the group of 15 mg ND/kg after the recovery period of 60 days. The ovarian weight has been reduced and the uterine has increased ($p < 0.05$) in comparison with the control due to the treatment with ND and it was only recovered at 60 days post-treatment in the groups that reestablished the estrous cycle. There was a reduction ($p < 0.05$) in the number of corpora lutea, antral and growing follicles and decreased in uterine endometrial layer, in contrast with an increase ($p < 0.05$) in atretic follicles, myometrium and perimetrium in the androgenized rats in a dose and time-dependent manner. Remarkable histopathological changes occurred in the ovaries and uterus of all groups treated with ND depending on the period assessed and were related to the levels of sex hormones and expression of altered ovarian receptors in a dose-specific manner. It was concluded that the experimental treatment with ND promoted ovarian and uterine toxicity in rats in a dose-dependent manner and the 60-day recovery period was sufficient for the reversibility of side effects only in treatment with lower steroid doses in a way that hormonal levels and expression of ovarian receptors could recover after remarkable dysregulation promoted by the androgenic treatment.

Keywords: Nandrolone decanoate. Ovary. Uterus. Histopathology. Immunoexpression. Hormonal assay. Pos-treatment recovery. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – síndrome de imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome);

a.m. – após meia-noite (after mid-night);

ANOVA – análise de variância paramétrica (parametric analysis of variance);

AR(s) – receptor androgênico (androgen receptor);

ARKO – androgen receptor knockout;

ASS(s) – anabolic androgenic steroid(s);

At – atretic follicle;

BSA – albumina de soro bovino (bovine serum albumin);

BW – body weight;

C – Controle (Capítulo III);

C – uterine cavity (capítulo I);

°C – Celsius;

CA – Califórnia;

CD – controle diestro (control group induced to death in diestrus phase);

CE – controle estro (control group induced to death in estrus phase);

CL – corpo lúteo (corpus luteum);

cm – centímetros (centimeters);

CO – Colorado;

CYP19 – citocromo P450 aromatase;

CYP450 – citocromo P450 aromatase;

DAB – cromógeno diaminobenzidina (chromogen diaminobenzidina);

DAPI – 6-diamidinoi-2-phenylindole;

DHT – diidrotestosterona (dihydrotestosterone);

DN – decanoato de nandrolona;

E – endometrial connective tissue;

E2 – estradiol (estradiol);

EAA – esteroide(s) anabólico(s) androgênico(s);

ec – epithelial cysts;

ER(s) – receptor estrogênico (estrogen receptor);

ERKO – estrogen receptor knockout;

ER- α – receptor estrogênico alfa (estrogen receptor alpha);

α -ERKO – estrogen receptor α knockout;

ER- β – receptor estrogênico beta (estrogen receptor beta);

β -ERKO – estrogen receptor β knockout;

et al. – entre outros (em latim);

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

Fig. – figura (figure);

FSH – hormônio folículo estimulante (follicle stimulate hormone);

g – gramas (gram);

g% - peso relativo (relative organ weight);

GC – glandular cysts;

GD1 – day 1 of gestation;

GD19 – gestate until the 19th day;

h – hora (s) (hours);

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio;

HE – hematoxylin and eosin;

hr – hora(s) (hours);

kg – quilograma (kilogram);

IOD – densidade óptica integrada;

i.p. – intraperitoneal;

IT – intersticial tissue;

L – luminal secretion with polymorphonuclear leukocytes;

LH – hormônio luteinizante (luteinizing hormone);

M – myometrium (capítulo I);

M – molar (capítulos II e III);

mA – microamperes;

mg – miligrama (milligram);

min – minutos;

ml – mililitro (milliliter);

mm – milímetros (millimeters);

n – número amostral (amostral number);

nm – nanômetros (nanometer);

ng – nanogramas;

ND – nandrolone decanoate;

PAS-H – ácido periódico de Schiff (periodic acid-Schiff-Hematoxylin);

PBS – solução salina tamponada com fosfato (phosphate-buffered saline);

p.c. – peso corporal;

PR(s) – receptor de progesterona (progesterone receptor);

s.c. – subcutânea (subcutaneous);

SD – standard deviation;

SEM – média \pm erro padrão;

SHBG – serum sex hormone-binding globulin

SOP – síndrome dos ovários policísticos;

SP – São Paulo;

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro;

RT – room temperature;

TA – temperature ambiente;

TBS-T – solução salina de tampão Tris e Tween 20;

tODFs – transdifferentiated oocyte-depleted follicles;

UNESP – Universidade Estadual Paulista;

µg – microgramas;

µl – microlitro (microliter);

µm – micrômetro (micrometer);

USA – United States of America;

v – vasodilatation;

v/v – volume/volume;

W – Watts;

WT – wild-type;

x g – gravidade;

SUMÁRIO

I. Introdução.....	16
1.1. Aspectos gerais dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA).....	16
1.1.1. Efeitos colaterais dos EAA no organismo.....	17
1.1.2. Efeito dos EAA na reprodução feminina.....	18
1.2. EAA: correlação com os receptores AR, ER, CYP19 e Inibina e hormônios sexuais.....	19
II. Objetivos.....	27
III. Capítulos.....	28
3.1. <u>Capítulo I</u> : <i>Dose-Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats</i>	28
3.2. <u>Capítulo II</u> : <i>Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods</i>	40
3.3. <u>Capítulo III</u> : <i>Efeitos do decanoato de nandrolona na regulação ovariana de ratas após os períodos de tratamento e de recuperação</i>	53
IV. Conclusão geral.....	100
V. Referências Bibliográficas.....	101
VI. Anexos.....	111

I. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA)

Os EAA são derivados sintéticos da testosterona ou um de seus derivados, que possuem tanto atividade androgênica quanto anabólica, sendo que os efeitos anabólicos estão relacionados à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não reprodutivos, e os efeitos androgênicos à função reprodutiva e características sexuais secundárias (BERNE e LEVY, 2000; DE LIMA e CARDOSO, 2011). Os EAA atuam sobre os receptores de andrógenos, os quais são expressos em praticamente todas as células do corpo, modulando de forma indissociável tanto os efeitos anabólicos quanto os androgênicos (BAHRKE e YESALIS, 2004; KICMAN, 2008), de modo que nenhum esteroide sintético disponível é capaz de desencadear somente efeitos anabólicos (CLARKSON e THOMPSON, 1997; LISE et al., 1999). A relação anabólica/androgênica varia conforme o tipo de substância utilizada (CUNHA et al., 2004).

Há vários tipos de EAA no mercado, mas o decanoato de nandrolona é um dos mais utilizados no mundo (KUTSCHER et al., 2002), sendo no Brasil comercializado como Deca-Durabolin[®] e considerado um dos esteroides mais populares (ICHIHARA et al., 2001). Foi introduzido no mercado em 1962 como uma preparação anabólica injetável, com ação prolongada de até três semanas após administração intramuscular em humanos. Sua substância ativa é a nandrolona, que comparativamente à testosterona, apresenta moderado potencial androgênico e elevada atividade anabólica (PERRY et al., 2005; SILVA et al., 2007).

Clinicamente os EAA têm sido prescritos para o tratamento de doenças associadas ao estado catabólico do paciente, tais como, nas condições de AIDS,

doença pulmonar obstrutiva crônica, deficiência hepática ou renal, câncer, casos de queimaduras e recuperação pós-cirúrgica (SHAHIDI, 2001; KICMAN, 2008). Também são utilizados na reposição hormonal pós-menopausa (ARLT, 2006), na restauração dos níveis hormonais em homens com hipogonadismo e nos casos de sarcopenia relacionada com a idade (EVANS, 2004). No entanto, o uso de EAA sem fins terapêuticos tem sido realizado por muitas pessoas por razões estéticas e tem se tornado um problema de saúde pública, despertando a atenção da comunidade científica (CAMARGO et al., 2009b).

1.1.1. Efeitos colaterais dos EAA no organismo

Por mais que a prescrição e comercialização dos EAA esteja controlada em diversos países (KICMAN, 2008), tais drogas são utilizadas indiscriminadamente por atletas ou não, na procura por uma melhora no desempenho em curto período de tempo ou simplesmente motivados pela estética (RIBEIRO, 2001).

Geralmente essas drogas são administradas em doses suprafisiológicas (FERMO et al., 2008), sendo de cinco a 29 vezes superiores ao nível basal recomendado de reposição fisiológica de testosterona (PERRY et al., 2005), ou podem alcançar até 100 vezes a recomendação terapêutica para várias doenças (CLARK e FAST, 1996). Dentro de algumas semanas de suspensão do tratamento, a força e massa muscular são reduzidas, tornando esta uma das razões de seu uso crônico (BONETTI et al., 2007).

Numerosos efeitos adversos promovidos pelos esteroides sintéticos são dependentes da dose e tempo de uso (SILVA et al., 2002; CUNHA et al., 2004; KAM e YARROW, 2005; BONETTI et al., 2007). Estes efeitos incluem o aumento da libido, redução do volume testicular, presença de acne, ginecomastia, calvície e impotência

(O'SULLIVAN, 2000), além de hipertensão e arterosclerose, coagulação sanguínea, carcinoma hepático, destruição de tendão e desordens psiquiátricas e comportamentais (MARAVELIAS et al., 2005).

Nas mulheres que cronicamente recebem doses suprafisiológicas de andrógenos, os efeitos adversos manifestam-se por masculinização, evidenciada pelo engrossamento da voz e crescimento de pelos no corpo, atrofia das mamas, agressividade, irregularidade menstrual e hipertrofia clitoriana (HOFFMAN e RATAMESS, 2006; KICMAN, 2008). Alguns destes efeitos são irreversíveis após a interrupção do uso de EAA, tais como, a hipertrofia clitoriana e o engrossamento da voz (KAM e YARROW, 2005). As mulheres também são acometidas com perturbações na função gonadal, demonstrada por puberdade tardia, deficiência da fase lútea, oligoamenorreia, anovulação e menor receptividade sexual (CANNAVÒ et al., 2001).

1.1.2. Efeito dos EAA na reprodução feminina

Embora os estudos relatem principalmente o uso de EAA por homens, tem-se observado um aumento significativo do uso por mulheres durante a última década (YESALIS et al., 2000; THIBLIN e PETERSSON, 2005). Poucos estudos sobre quaisquer aspectos dos efeitos dos EAA na população humana ou animal têm sido realizados em fêmeas (CLARK et al., 2006). Este panorama não se alterou nos últimos anos, principalmente na área morfológica reprodutiva.

Apesar de ainda serem escassos os estudos sobre os efeitos que os EAA causam na reprodução feminina, estudos conduzidos em nosso laboratório relataram que o esteroide sintético decanoato de nandrolona é capaz de causar alterações no ciclo estral (GEREZ et al., 2005, CAMARGO et al., 2009a; CHUFFA et al., 2011; CAMARGO et al., 2014), alterações histopatológicas nos ovários e útero (GEREZ et al.,

2005; CAMARGO et al., 2009a; CHUFFA et al., 2011; CAMARGO et al., 2014) e é capaz de suprimir a capacidade reprodutiva das fêmeas (CAMARGO et al., 2009b; CAMARGO et al., 2014; BELARDIN et al., 2014). Segundo WOLF et al. (2002), os esteroides sintéticos também promovem atresia vaginal na progênie exposta *in utero* aos efeitos androgênicos.

1.2. EAA: Relação com os receptores AR, ER, CYP19 e Inibina e hormônios sexuais

Tanto os EAA quanto seus metabólitos exercem suas funções quando ligados aos receptores de andrógeno (AR). No entanto, os EAA, incluindo a nandrolona, podem ser aromatizados pela enzima citocromo P450 aromatase em estrogênios que, por sua vez, exercem suas atividades através dos receptores de estrógeno - ERs (conhecidos pelas isoformas ER- α e ER- β) (SHAHIDI, 2001; CLARK et al., 2006; DRUMMOND et al., 2012). Ambas as sinalizações mediadas por AR e ER são extremamente importantes para direcionar a ação dos esteroides nos ovários, e qualquer alteração na regulação hormônio-receptor pode comprometer a função deste tecido, e até mesmo levar a danos fisiopatológicos irreversíveis. Ao mesmo tempo em que os andrógenos apresentam um efeito benéfico sobre a foliculogênese, também apresentam um efeito adverso, potencializando a atresia folicular e induzindo a apoptose nas células granulosas (CONWAY et al., 1990; BILLIG et al., 1993).

Segundo EHRAMNN (2005), um ambiente excessivamente androgênico está associado a patologias no trato reprodutor feminino, dentre elas a síndrome dos ovários policísticos (SOP). Nesta condição, os ovários exibem aumento no número de cistos foliculares e corpos lúteos ocasionais, sendo que as células tecais dos folículos císticos apresentam forte expressão nuclear para o AR (CHADHA et al., 1994). A morfologia

ovariana de ratas tratadas com esteroides sintéticos apresenta aspecto similar ao da SOP (CAMARGO et al., 2014; SIMÃO et al., 2015). A expressão do RNAm e a proteína ER- β são reduzidas nas células granulosas e células tecais de pacientes com SOP (JAKIMIUK et al., 2002).

Em tecidos ovarianos normais, a expressão dos ARs e ERs varia em quantidade e tipo celular. Uma representação esquemática simplificada do ovário, indicando os sítios de receptores de hormônios esteroides é mostrada na Figura 1.

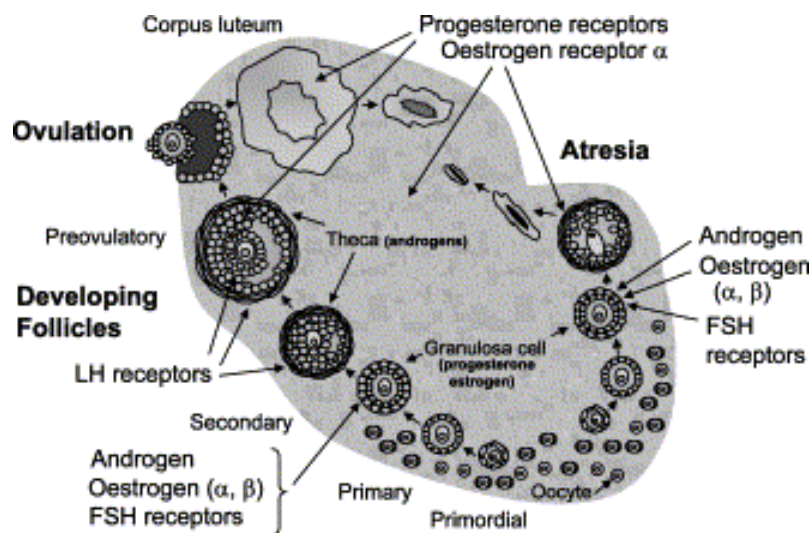


Figura 1. Sítios de receptores de hormônios esteroides, sítios celulares de produção de hormônios esteroides e estruturas foliculares relevantes (DRUMMOND et al., 2002).

A proteína AR e o RNAm AR estão presentes no oócito, células da granulosa e células da teca dos ovários de roedores (TETSUKA et al., 1995; SZOLTYS e SLOMCZYNSKA, 2000). A imunomarcação do AR diminui progressivamente nas células granulosas periféricas dos folículos antrais no último estágio de desenvolvimento, mas um pouco das células que margeiam o antro e o *cumulus* mantém forte coloração AR-positiva (SZOLTYS e SLOMCZYNSKA, 2000). Embora a expressão do AR esteja presente nos vários estágios de desenvolvimento folicular, o

padrão distinto desta expressão é mostrado dentro dos folículos de diferentes espécies de mamíferos, na qual se pode destacar a importância do estágio de desenvolvimento folicular e as diferenças espécies-específicas para a expressão do AR (WALTERS et al., 2008).

Os andrógenos exógenos exercem efeitos inibidores ou estimulantes nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular (WANG e CHANG, 2004; WALTERS et al., 2008). No entanto, não é bem conhecido se os efeitos se devem somente ao mediador AR ou também à conversão do andrógeno a outros esteroides, com potencial de exercer ações indiretas, tais como, a via ER. Segundo CHADA et al. (1994), pacientes transexuais que recebem altas doses de andrógeno exógeno durante um longo período de tempo, fornecem a oportunidade única e eticamente aceitável para estudar os efeitos morfológicos e endócrinos dos andrógenos sobre os ovários e útero. No entanto, nas últimas décadas, o emprego de linhagens animais AR *Knockout* e ER *Knockout* tem contribuído significativamente para ampliar o conhecimento sobre o papel destes receptores nos tecidos reprodutivos.

O estrógeno é um modulador intrafolicular essencial para a foliculogênese, com funções independentes atribuídas a cada uma das isoformas, ER- α e ER- β . O ER- β é a forma predominante nos ovários, expresso principalmente pelas células granulosas. É requerido para a formação do antro, maturação do folículo pré-ovulatório, expressão de genes envolvidos na diferenciação ovariana (LH, aromatase, etc), e ruptura folicular durante a ovulação. O ER- β também pode exibir propriedades antitumorigênicas ao inibir o crescimento e estimular a apoptose celular a partir do aumento da expressão do receptor em células epiteliais cancerosas que tipicamente apresentam um declínio nos níveis de ER- β (DRUMMOND et al., 2012). Em pacientes com SOP, a expressão do ER- β é reduzida nas células granulosas e células tecais (ZURVARRA et al., 2009). O

ER- α , embora não predominante nos ovários, é importante para a manutenção da fertilidade e função ovariana (DRUMMOND et al., 2002). A presença do receptor tem sido demonstrada pela imunohistoquímica na superfície epitelial ovariana e nas inclusões císticas epiteliais de mulheres na pós-menopausa (MENDEZ et al., 2013).

Os ERs são encontrados em altos níveis nos tecidos femininos para a função reprodutiva, incluindo os ovários, útero, cérvix e glândula mamária. O desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos nos quais ocorrem a ausência de estrógenos ou ER fornece uma ferramenta valiosa na definição dos mecanismos pela qual os estrógenos exercem seus efeitos nos vários sistemas (HEWITT et al., 2000). Assim, os ovários do tipo natural mostram desenvolvimento folicular normal e indicações de ovulação. Os ovários α -ERKO mostram grandes estruturas císticas hemorrágicas e prejuízo no desenvolvimento folicular sem indicação de ovulação, enquanto os ovários β -ERKO mostram ocorrência de desenvolvimento folicular, mas com pouca indicação de sucesso na ovulação (Figura 2).

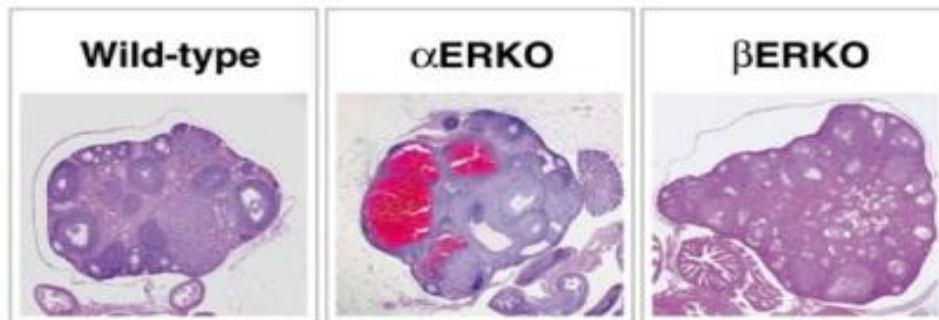


Figura 2. Patologia ovariana de fêmeas de camundongos ERKO (HEWITT et al., 2000).

CHUFFA et al. (2013) demonstraram que a expressão dos AR, ER e PR (receptor de progesterona), nos órgãos genitais femininos internos, são muito sensíveis aos efeitos tóxicos de substâncias químicas, como por exemplo, o etanol e a melatonina, e que não obstante, também foram correlacionados com alterações dos

níveis de LH, estradiol e progesterona. O papel dos estrógenos e andrógenos mediados pelos seus receptores específicos já é bastante documentado na literatura, porém é ainda incerta a ação dos EAA sobre a regulação dos complexos E2-ER e andrógeno-AR. A elevada expressão de AR nas células estromais e epiteliais uterinas indica uma influência direta dos andrógenos na manutenção das funções do útero, contudo, ainda é alvo de debate se a suplementação com andrógenos mantém ou suprime os níveis de AR. Por outro lado, TIBBETTS et al. (1998) evidenciaram que o aumento de estradiol está associado com a redução da expressão de ER pelo útero, enquanto a progesterona é capaz de reduzir tanto os ERs quanto os próprios receptores de progesterona (PRs).

MATSUMOTO et al. (2008) relataram que pouco se conhece sobre a ação dos andrógenos na fisiologia feminina, e que a sinalização de andrógeno mediada pelo AR também desempenha uma função importante no sistema reprodutor feminino. A importância foi demonstrada através de fêmeas de camundongos AR *Knockout* (ARKO) – Figura 3. Assim, nos ovários deficientes de AR, as fêmeas com 8 semanas de idade apresentaram aumento no número de folículos atrésicos e redução no número de corpos lúteos. Na 40ª semana, os ovários não exibiram folículos e as fêmeas tornaram-se inférteis, reforçando a evidência de um papel essencial do AR também na função reprodutiva feminina.

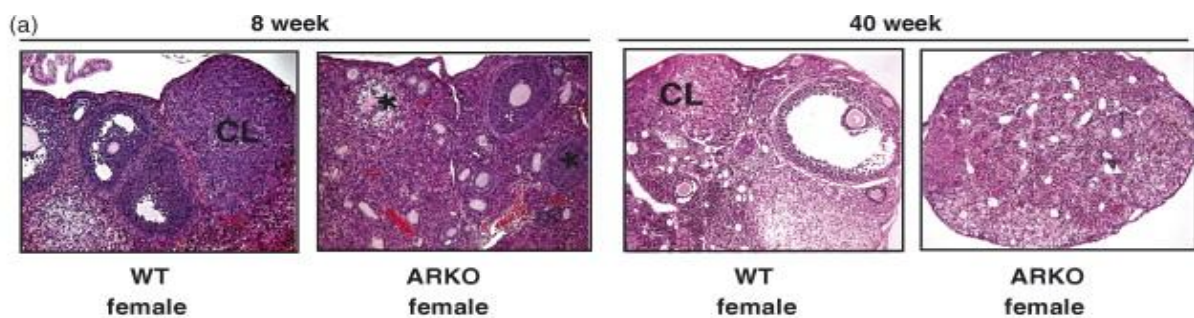


Figura 3. Deficiência ovariana prematura em fêmeas de camundongos ARKO.

Histologia do ovário ARKO na 8ª e 40ª semana de idade (MATSUMOTO et al., 2008).

A etapa mais importante na esteroidogênese da mulher é a aromatização dos andrógenos, a qual resulta na geração de estrógenos. Este processo é mediado pela enzima citocromo P450 aromatase e é observada no retículo endoplasmático de células granulosas dos ovários (CARREAU et al., 2002; KIRILOVAS et al., 2006). A atividade desta enzima diminui gradualmente nos ovários após a menopausa e é significativamente reduzida após 10 anos da última menstruação (BRODOWSKA et al., 2014). É bem documentado que a administração de EAA causa aumento dos níveis de estrógenos circulantes pela atividade da enzima citocromo P450 aromatase (CYP19). Os andrógenos regulam a expressão do mRNA e acentuam a atividade da enzima aromatase via AR (ROSELLI e RESKO, 1993), e também atuam diretamente como substrato para a aromatase.

Em estudo realizado com homens envolvendo a administração do EAA decanoato de nandrolona em combinação com outros esteroides sintéticos mostrou redução dos níveis séricos de testosterona (53%), LH (77%) e FSH (87%), e aumento dos níveis de estradiol (45%). Além disso, o tecido glandular mamário desses homens apresentou um aumento da expressão de AR e ER, onde os ERs foram significativamente mais abundantes no citosol e núcleo da célula em comparação aos ARs (CALZADA et al., 2001).

Relacionadas ao controle da secreção do FSH as inibinas são moléculas multifuncionais que possuem duas formas moleculares ativas na circulação, a inibina A e a inibina B, cuja expressão no ovário humano foi demonstrada nas células granulosas de folículos antrais e pré-ovulatórios, e células luteínicas de corpos lúteos ativos, e o padrão se altera durante o ciclo sexual (HAYES et al., 1998; LUISI et al., 2005). A expressão da inibina é escassa ou ausente nas células tecais e células intersticiais (YAMOTO et al., 1992). A inibina A é secretada principalmente pelo corpo lúteo, e está

envolvida no *feedback* negativo do controle de secreção do FSH durante a fase de transição luteal-folicular. No último estágio de desenvolvimento folicular dominante, a inibina A está quatro vezes mais concentrada no fluido folicular que no soro (KLEIN et al., 1996). As concentrações de inibina A podem servir como fator prognóstico para prever a retomada da função ovariana (LUIZI et al., 2005). A inibina B é secretada pelos folículos antrais em resposta ao FSH, e é o principal marcador de crescimento folicular. Dessa maneira, o nível de inibina B é um marcador da função ovariana, na qual pode tornar-se útil para identificar a capacidade de resposta à indução da ovulação (LUIZI et al., 2005). Nos tumores estromais, particularmente nos tumores das células da granulosa, a inibina é um valioso marcador tumoral (ROBERTSON et al., 2002, 2007; MOM et al., 2007; WALENTOWICZ et al., 2014). Os níveis séricos de inibina total são elevados em mulheres com câncer ovariano, em particular aqueles tumores de células granulosas e aqueles com subtipo mucoso de carcinoma epitelial (ROBERTSON et al., 2004). Conforme COOKE et al. (1995), há duas possíveis explicações para que a inibina funcional seja secretada pelos tumores epiteliais. Primeiro, ela pode refletir uma resposta estromal para o tumor. Segundo, pode refletir a habilidade intrínseca da superfície epitelial do ovário para secretar inibina, tal como a origem embriológica é compartilhada com o resto do tecido genital. No caso da síndrome dos ovários policísticos há um aumento nos níveis de inibina devido à persistência de um grupo de pequenos folículos que contribuem para a associação de inibinas circulantes, mas o ritmo pulsátil da secreção de inibina B é atenuado (LOCKWOOD et al., 1998).

Tendo em vista que os efeitos dos EAA são dependentes da dose e do tecido, e, sobretudo, variam conforme o período de exposição, a idade e o sexo, estudos são necessários para esclarecer o papel dos EAA frente à interface hormônio-receptor nos

tecidos reprodutivos femininos. Neste contexto, haveria maiores prejuízos reprodutivos à medida que se aumenta a dose do esteroide? Haveria reversibilidade dos efeitos colaterais após um período de repouso? Qual é a resposta histoquímica e hormonal na comparação das doses e períodos de avaliação?

Com base nessas questões, o presente projeto tem como hipótese de que há uma relação dose-dependente do tratamento com decanoato de nandrolona sobre os efeitos colaterais na capacidade reprodutiva, resposta hormonal, imunoexpressão dos receptores esteroidais e sobre as alterações histopatológicas no tecido ovariano e uterino de ratas, em consequência, a possibilidade de recuperação tenderá a ser período-dependente, com a maior dose esteroideal necessitando de um maior período de repouso para a reversibilidade das injúrias ocasionadas pelo tratamento com o EAA.

II. OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de diferentes doses de decanoato de nandrolona nos ovários e útero de ratas, nos períodos de tratamento e em dois períodos de recuperação distintos (30 e 60 dias), por meio de imunolocalização dos receptores androgênicos (AR), estrogênicos (ER- α e ER- β), citocromo P450 aromatase (CYP19) e inibina A, envolvidos na regulação hormonal e determinar os níveis séricos dos hormônios FSH, LH, estradiol, progesterona, testosterona e DHT. Também se objetivou avaliar o ciclo estral das ratas nos diferentes períodos do estudo, e se os efeitos colaterais são reversíveis após a interrupção do tratamento esteroideal.

CAPÍTULO I

*Dose-Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by
Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats*

Larissa Berloff Belardin, Vinícius Augusto Simão, Gabriel Adan Araújo Leite, Luiz
Gustavo de Almeida Chuffa e Isabel Cristina Cherici Camargo

Trabalho publicado no periódico *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 101: 168-177. 2014.

Original Article

Dose-Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats

Larissa Berloff Belardin,¹ Vinícius Augusto Simão,¹ Gabriel Adan Araújo Leite,¹
Luiz Gustavo de Almeida Chuffa,² and Isabel Cristina Chericí Camargo^{1*}

¹Faculty of Sciences and Letters, Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista—UNESP, Assis, São Paulo, Brazil

²Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista—UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

This study is the first to investigate the effects of different doses of nandrolone decanoate (ND) upon uterine tissue and fertility, and if the reproductive alterations can be restored after cessation of the treatment. Wistar female rats were treated with ND at doses of 1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg/kg body weight, diluted in vehicle ($n = 30$ /group), or received only mineral oil (control group, $n = 45$). The animals were divided into three periods of study: ND-treated receiving a daily subcutaneous injection for 15 consecutive days (1), and treatment with ND followed by 30-day recovery (2), and 60-day recovery (3). At the end of each period, five females per group were induced to death to histopathological analysis and the others were allowed to fertility evaluation (at 19th gestational day). Animals that received ND followed by 30-day recovery exhibited persistent diestrous and marked suppression of reproductive capacity. Conversely, after 60-day recovery, only lowest doses females (1.87 and 3.75 mg/kg) exhibited restoration of normal estrous cyclicity. Uterine weights were increased after ND treatment similarly to that of the controls after 60-day recovery. The ND-treated groups showed histopathological changes in the endometrium, myometrium, and perimetrium, and an increase in the thickness of both muscular and serous layers. Notably, the recovery of uterine tissue after ND treatment was dose- and period-dependent. We reported that administration of ND promoted damage in uterine tissue and fertility of rats, and the recovery periods were insufficient to restore all of the side effects caused by ND under a dose-dependent response. *Birth Defects Res (Part B)* 101:168–177, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *nandrolone decanoate; uterus; histomorphometry; fertility; recovery period; reproductive toxicology; rats*

INTRODUCTION

Anabolic androgenic steroids (AASs) are synthetic drugs derived from testosterone (Bahrke and Yesalis, 2004), clinically recommended for androgen replacement therapy and treatment of refractory anemia, hereditary angioedema, breast cancer, as well as during cachexia and sarcopaenia associated with the catabolic state of the patients (Shahidi, 2001; Karbalay-Doust and Noorafshan, 2006; Kicman, 2008). AASs, including testosterone and its analogues, have also been used by adolescents and adults, athletes, and nonathletes to increase muscle mass, strength, and physical dexterity (Iriart and Andrade, 2002).

In modern society, AASs are used by many people for aesthetic reasons and its use has increased among youth and adult. AASs are often administered at supraphysiological doses (Fermo et al., 2008), which are 5- to 29-fold higher than the dose recommended for the hormonal replacement (Perry et al., 2005) or reach up to 100 times the

therapeutic dose recommended for the treatment of various diseases (Clark and Fast, 1996).

Administration of AASs by women is associated with certain androgenic effects such as hirsutism, deepening of the voice, clitoral enlargement, breast atrophy, and menstrual irregularities (Bahrke and Yesalis, 2004; Hoffman and Ratamess, 2006; Kicman, 2008). Moreover, alterations in gonadal function such as delayed puberty, luteal phase deficiency, oligo-amenorrhea, or anovulation may occur in women who use these drugs (Cannavò

*Correspondence to: Isabel Cristina Chericí Camargo, Faculty of Sciences and Letters, Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista—UNESP, Av Dom Antonio 2100, Assis, SP 19806-900, Brazil.
E-mail: camargo@assis.unesp.br

Grant sponsor: FAPESP—São Paulo Research Foundation; Grant numbers: 2012/03813-0, 2012/01747-0.

Received 6 December 2013; Accepted 26 January 2014

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com/journal/dbdr) DOI: 10.1002/dbdr.21104

et al., 2001). Unfortunately, some of these changes are irreversible after cessation of AAS treatment (Kam and Yarrow, 2005).

Although the deleterious effects promoted by AASs are well documented, few studies have focused attention to their effects on female reproductive tissues and fetal parameters. Our previous studies reported that ND is able to cause changes in the estrous cycle (Gerez et al., 2005; Camargo et al., 2009a; Chuffa et al., 2011), histopathological alterations in the ovaries and uterus (Gerez et al., 2005; Camargo et al., 2009a; Chuffa et al., 2011), and damage to the fertility (Camargo et al., 2009b). Synthetic steroids also promote vaginal atresia in offspring exposed "in utero" to the androgenic effects (Wolf et al., 2002). However, no study have evaluated the dose-dependent effect of the ND on uterine tissue and gestational parameters, and if the side effects can be reversed after the cessation of the steroidal treatment.

To better understand this issue, the study was conducted to verify the effects of different doses of ND upon uterine tissue and fertility, and if the reproductive alterations can be restored following 30- and 60-day recovery after cessation of treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

One hundred sixty-five adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), 12-week old (weighing ± 250 g), were obtained from the Univ. Estadual Paulista (UNESP—Botucatu, SP, Brazil) and kept in appropriate cages at the Faculty of Sciences and Letters (UNESP—Assis, SP, Brazil). The females were weighed and randomly divided into four experimental groups ($n = 30$ /group): Group 1, rats receiving doses of 1.87 mg ND/kg body weight (BW) + vehicle, via s.c., for 15 consecutive days; Group 2, rats receiving doses of 3.75 mg ND/kg BW + vehicle, via s.c., for 15 consecutive days; Group 3, rats receiving doses of 7.5 mg ND/kg BW + vehicle, via s.c., for 15 consecutive days; Group 4, rats receiving doses of 15 mg ND/kg BW + vehicle, via s.c., for 15 consecutive days. Two control groups received 0.1 mL mineral oil as vehicle (control group induced to death in estrous—CE, $n = 30$; control group induced to death in diestrus—CD, $n = 15$). The CD group was used in this study based on previous report that AAS treatment promotes persistent diestrus (Camargo et al., 2009a, 2009b; Bento-Silva et al., 2010). Then, the arrangement of CE and CD groups will compare the results between the groups with regular estrous cycle, and groups with abnormal estrous cycle.

The doses of ND are similar to an adult weighing 70 kg (ranging from 147 to 1190 mg ND; Evans, 1997), mimicking the therapeutic doses used for treating several diseases or body disturbances. According to the allometric calculation (Reagan-Shaw et al., 2007), the doses of 1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg represent, respectively, 0.30, 0.61, 1.22, and 2.43 mg ND/kg in humans. The therapeutic doses recommended for treating osteoporosis, hypogonadism, and chronic renal failure are, respectively, 50 mg ND/3 weeks, 100 mg ND/week, and 100 to 200 mg ND/week. Importantly, a nonmedical dose of ND can range from 200 to 3200 mg/week (Evans, 1997).

Following the treatment period, each experimental group was redistributed according to the three periods of study ($n = 10$ animals/group/period): ND-treated receiving a daily subcutaneous injection for 15 consecutive days (1), and treatment with ND followed by recovery for 30 days (2), and 60 days (3). At the end of each period, the females ($n = 5$ /group) were induced to death and the uterus was collected and processed for histological techniques, and the remaining five rats per group were mated and allowed to fertility study (Fig. 1 A–C).

All animals were housed in polypropylene cages (43 cm \times 30 cm \times 15.0 cm) with laboratory-grade pine shavings as bedding and also maintained under controlled room temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and lighting conditions (12 hr/12 hr light/dark photoperiod, lights switched on at 7 a.m.).

Nandrolone decanoate (4-estren-17 β -ol-3-one 17-decanoate) was purchased from Schering-Plough Laboratory (São Paulo, Brazil) as an injectable solution, containing 50 mg of the androgen. The treated females received different doses of ND (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg/kg BW of Deca Durabolin), available as oily solution (Marqueti et al., 2010). ND injections were administered at the same time (11:30 a.m.) to minimize the changes in estrous cycle. Control groups were handled and received the same procedure applied to the treated groups. All animals received tap water and commercial Nuvital chow ad libitum. The experimental protocol followed the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (Permit number: 005/2011).

BW Gain

Individual BW (g) was measured weekly and the difference between the final and initial BW was divided by the number of weeks in each period of evaluation. The determination of BW was carried out using an analytical balance.

Assessment of Estrous Cycle

During the experiment, all of the animals were accompanied by cytological examination (vaginal swabs) in the three periods of study ($n = 10$ /group/time point). Cells detaching from the vaginal epithelium were removed with a pipette (Lab Mate, Colonia, New Jersey, 0.5–10 μl). The filter tips containing 10 μl of 0.9% saline solution (Marcondes et al., 2002) were discarded after the vaginal secretion had been transferred to clean slides. The time of collection was fixed at 9 a.m. Each slide was analyzed under a light microscope (Olympus CX31 RBSFA, Japan) at 10 \times and 25 \times magnification. This method is similar to Goldman et al. (2007). The phases of cycle were identified as: (1) proestrous, consisting of clusters of round, nucleated epithelial cells; (2) estrous, with predominance of enucleated cornified cells; (3) metaestrous, consisting of a combination of leukocytes and cornified rounded epithelial cells; (4) diestrus, with predominance of leukocytes (Goldman et al., 2007).

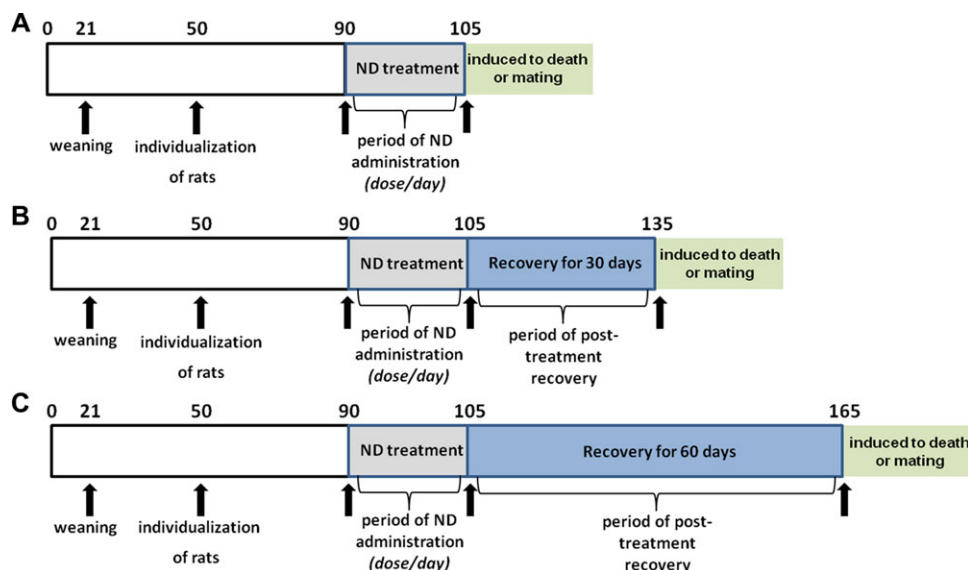


Fig. 1. Detailed chronological schedule for the experimental design (days). (A) Ten rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg) were set aside for end of dosing period, five induced to death, and five put into mating trial after which were allowed to gestate until the 19th day (GD19). (B) Ten rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg) were maintained for 30-day recovery evaluation with five induced to death and five put into mating trial after which were allowed to gestate until the 19th day (GD19). (C) Ten rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg) were maintained for 60-day recovery evaluation with five induced to death and five put into mating trial after which were allowed to gestate until the 19th day (GD19).

Histopathological Analysis

After the experimental period, the females ($n = 5$ rats/group) displaying regular or irregular estrous cycle were induced to death through a lethal dose of sodium thiopental (Thiopentax, Cristalia, São Paulo, Brazil), via i.p. The uterine horns were collected and weighed, being obtained the relative weight (organ weight/BW $\times 100$), expressed as g%.

The uteri were fixed in Bouin's solution and processed by the usual histological routine for paraffin embedding (Paraplast Labware-Oxford, St. Louis, MO). The blocks were sliced into 5- μ m-thick sections in a RM2125 LEICA microtome (Germany) and stained with Mallory's trichomic (for collagen fibers, muscle fibers, cytoplasm, mucus, and ground substance; Tolosa et al., 2003), Van Gieson (for collagen and elastic fibers; Jocelyn and Bruce-Gregorios, 1974), and periodic acid-Schiff-Hematoxylin (PAS-H) (for polysaccharides such as glycogen, and mucosubstances such as glycoproteins and glycolipids; Tolosa et al., 2003) for distinguishing cellular from extracellular matrix components in uterine layers. Histological samples of uterine horns were handled in a blinded fashion study. Finally, the slides were analyzed and captured with a digital photomicroscope. Based on the cross-sections of the uterus, the following parameters were measured: height of the luminal epithelium, and thickness of the endometrium, myometrium, and perimetrium layer (μ m). All measurements were performed in optical microscope (Scope A1-Axio [Carl Zeiss, Germany] coupled with video-camera AxioCam ICc3 [Carl Zeiss] and digitalized by the software Axio Vision, version 4.7.2).

Fertility Study

At the end of the experimental period, five females per group were individually mated with an untreated adult male (Wistar, 120 days of age, weighing ± 280 g), obtained from the Univ. Estadual Paulista (UNESP—Botucatu, SP, Brazil), and maintained in the Central Biotherium of the Faculty of Sciences and Letters (UNESP—Assis, SP, Brazil). The couples of rats were kept together for additional 4 hr after first evidence of sperm in vaginal smear, allowing a greater number of ejaculations. After mating, the presence of sperm in the morning vaginal smear was indicative of fertilization and was considered as day 1 of gestation (GD1). Pregnant females were kept in individual cages. On the 19th gestational day (GD19) after administering ketamine (40 mg/kg BW) and xylazine (20 mg/kg BW), via intramuscular, the abdominal cavity was opened to examine some structures. We recorded the number of implantations, number of gravid corpora lutea, number of live fetuses, litter size, fetal weight, and number of resorptions. The following formula were used: copulation rate (number of females with sperm in the smear/number of mated females in the group) $\times 100$; fertility rate (number of pregnant females/number of copulated females) $\times 100$; implantation rate (number of implants/number of corpora lutea) $\times 100$; pre-implantation loss rate (number of corpora lutea – number of implantations/number of corpora lutea) $\times 100$, and post-implantation loss rate (number of implants – number of fetuses/number of implants) $\times 100$, as described by Wato et al. (2009). The evaluation of fetotoxicity was performed through analysis of fetal external morphology, with a stereomicroscope (Citoval 2, Carl Zeiss).

Table 1
Evaluation of Estrous Cycle (Days) and Frequency of Persistent Arrest in Estrous and Diestrous Stage During the Whole Experimental Period ($N = 10/\text{Group}$)

Parameters	Experimental groups ($n = 10/\text{group}$)/period				
	Treatment period				
	Diestrous control*	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Number of estrous	4 ± 1 a	1 ± 1 b	1 ± 2 b	1 ± 0 b	1 ± 0 b
Number of diestrous	3 ± 2 a	13 ± 1 b	11 ± 1 b	12 ± 1 b	13 ± 1 b
Cycle duration (days)	5 ± 2.5	Acyclic	Acyclic	Acyclic	Acyclic
Post-treatment recovery for 30 days					
Parameters	Diestrous control*	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Number of estrous	6 ± 1 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
Number of diestrous	6 ± 1 a	30 ± 0 b	30 ± 0 b	30 ± 0 b	30 ± 0 b
Cycle duration (days)	5 ± 2.5	Acyclic	Acyclic	Acyclic	Acyclic
Post-treatment recovery for 60 days					
Parameters	Estrous control**	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Number of estrous	17 ± 3 a	3 ± 7 ab	4 ± 1 ab	1 ± 1 bc	0 ± 0 c
Number of diestrous	14 ± 3 a	52 ± 16 ab	50 ± 7 ab	58 ± 2 bc	60 ± 0 c
Cycle duration (days)	4 ± 1 a	6 ± 3 a	6 ± 2 a	Acyclic	Acyclic
Resumption cycle (days)	—	44 ± 14 a	40 ± 1 a	58 ± 1 b	Acyclic

Within each line, values followed by different letters indicate statistical differences among the groups ($p < 0.05$). Data are expressed as the median ± interquartile deviation.

*Control group induced to death in the diestrous phase.

**Control group induced to death in the estrous phase.

Statistical Analysis

The results were analyzed through parametric analysis of variance (ANOVA) complemented with the Tukey test, when the data presented normality and homoscedasticity, and were expressed as the mean ± standard deviation. Nonparametric Kruskal–Wallis test, followed by the Student–Newman–Keuls test, was performed when the data presented nonnormal distribution, and the results were expressed as the median ± interquartile deviation. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Estrous Cycle Examination

As shown in Table 1, all of the animals that received differential doses of ND and had post-treatment recovery for 30 days displayed continuous diestrous during the whole period. However, post-treatment recovery for 60 days was able to restore regular estrous cycle in animals treated with lowest doses (1.87 and 3.75 mg/kg); half of the females treated with 7.5 mg ND/kg were kept in diestrous while the other animals restored regular estrous cycle at 58-day recovery; animals that received the highest dose of ND (15 mg/kg) exhibited permanent diestrous until the end of experimental period.

BW Gain and Uterine Weight

Due to individual effect of treatment on estrous stage arrest and to maintain similar conditions for analysis, the ND-treated groups and ND-treated groups followed by 30-day recovery were compared with CD group, while

ND-treated groups followed by 60-day recovery were compared with CE group.

Table 2 shows that initial BW was similar ($p > 0.05$) among the groups, regardless of treatment and recovery period. According to the statistical analysis, the final BW was higher ($p < 0.05$) only in the group receiving 7.5 mg ND/kg compared to untreated animals after recovery for 30 days.

The BW gain was higher ($p < 0.05$) in androgenized groups at the end of dosing period, and maintained higher in those animals receiving doses of 3.75 and 7.5 mg ND/kg at 30 days after the last dose (Table 2). All doses in the post-treatment recovery for 60 days promoted the same BW gain ($p > 0.05$). There was a gradual decrease in the BW gain after the cessation of ND administration when 30- and 60-day recovery was considered.

Notably, ND-treated rats had a significant increase ($p < 0.05$) in uterine weights at the end of treatment compared to that of control in diestrous, except the group treated with low dose (Table 2). After the recovery periods for 30 and 60 days, the uterine weights were similar to the respective control group, and only animals that received higher doses (15 mg ND/kg) had increased uterine weights compared to low dose treated groups (1.87 and 3.75 mg ND/kg) after 30-day recovery. At the end of treatment, uterine weights were increased but were similar to control at 60 days after last dose (Table 2).

Uterine Histomorphometry

To maintain similar conditions based on the results of estrous cycle, uterine tissues were analyzed in diestrous

Table 2
Initial and Final Body Weight (g), Body Weight Gain (g) and Relative Uterine Weight (g%; Uterine Weight/Final Body Weight \times 100) in the Different Groups and Experimental Periods ($N = 10/\text{Group}$)

Parameters	Experimental groups ($n = 10/\text{group}$)/period				
	Treatment period				
	Diestrous control**	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Initial body weight	245 \pm 19.4 a	246 \pm 19 a	252 \pm 26.05 a	251 \pm 23.5 a	246 \pm 10.7 a
Final body weight	275 \pm 20.3 a	292 \pm 36.7 a	296 \pm 27.3 a	298 \pm 28.8 a	298 \pm 20.4 a
Body weight gain*	8 \pm 1.5 a	19 \pm 14.5 b	24 \pm 4.5 b	24 \pm 1.5 b	26 \pm 6 b
Uterine weight*	0.13 \pm 0.04 a	0.23 \pm 0.02 ab	0.27 \pm 0.12 b	0.32 \pm 0.28 b	0.28 \pm 0.02 b
Parameters	Post-treatment recovery for 30 days				
	Treatment period				
	Diestrous control**	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Initial body weight	269 \pm 20.5 a	292 \pm 31.4 a	283 \pm 32.8 a	294 \pm 23.2 a	292 \pm 11.2 a
Final body weight	289 \pm 30 a	320 \pm 32.4 ab	340 \pm 38 ab	352 \pm 36.6 b	321 \pm 11.7 ab
Body weight gain*	5.25 \pm 3.2 a	6.25 \pm 1.5 a	11 \pm 5 b	15 \pm 5 b	6.5 \pm 0.2 ab
Uterine weight*	0.18 \pm 0.03 ac	0.12 \pm 0.01 a	0.14 \pm 0.05 ab	0.16 \pm 0.02 bc	0.23 \pm 0.03 c
Parameters	Post-treatment recovery for 60 days				
	Treatment period				
	Estrous control***	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Initial body weight	275 \pm 8.9 a	308 \pm 18.5 a	292 \pm 23.2 a	305 \pm 34.3 a	285 \pm 21.8 a
Final body weight	308 \pm 20.1 a	339 \pm 3.0 a	344 \pm 30.3 a	355 \pm 53.1 a	336 \pm 24.8 a
Body weight gain*	4.01 \pm 1.8 a	3.89 \pm 3.0 a	6.65 \pm 1.9 a	6.87 \pm 3.3 a	6.14 \pm 2.1 a
Uterine weight*	0.16 \pm 0.02 a	0.18 \pm 0.01 a	0.16 \pm 0.06 a	0.15 \pm 0.03 a	0.18 \pm 0.03 a

Within each line, values followed by different letters indicate statistical differences among the groups ($p < 0.05$). Body weight gain ranged from 1 to 15 days for treatment period, 1 to 45 days for 30-day recovery groups, and 1 to 75 days for 60-day recovery groups.

*Data are expressed as the median \pm interquartile deviation. For initial and final body weight, the values are as the mean \pm SD.

**Control group induced to death in the diestrous phase.

***Control group induced to death in the estrous phase.

stage for all experimental groups in treatment period and at 30-day recovery after last dose. At 60-day recovery after last dose, uterine tissues were compared to control group in estrous stage, since the cyclicity was restored.

After ND treatment, a different pattern of uterine morphological architecture was found between the animals receiving doses of ND (Fig. 2D, G, J, M) and the control group (Fig. 2A). In androgenized females, a thin papillary epithelium constituted by elongated and irregular projections was notable in the group of 115 mg ND/kg, and the presence of various folds in the group of 3.75 and 7.5 mg ND/kg. The height of the luminal epithelium was reduced ($p < 0.05$) in ND-treated groups compared to the control group (Table 3), and the greatest reduction occurred with the dose of 7.5 mg ND/kg. The endometrial stroma showed remarkable edema in the groups receiving lower doses of steroids (Fig. 2D, G), and the thickness of the uterine tissue was reduced ($p < 0.05$) in the groups that received higher doses of ND (Table 3) compared to the control and low-dose groups. There was a disruption of the morphological architecture of the myometrium in ND-treated groups (Fig. 2G, J) and a significant increase ($p < 0.05$) in the thickness of myometrium layer (Table 3). Also, a significant increase in the thickness of perimetrium was found in the groups treated with lower doses (1.87 and 3.75 mg ND/kg) and with the highest dose (15 mg ND/kg) compared to the CD group. The dose of 7.5 mg ND/kg appears to have no effect on perimetrium layer, suggesting that this

layer is more responsive to either lower or higher dose of ND.

After the recovery period for 30 days, the epithelial papillae became mild or absent in the ND-treated groups, while endometrial stroma was predominantly fibrocellular (Fig. 2B, E, H, K, N). No significant difference ($p > 0.05$) in the height of the luminal epithelium was seen between the experimental groups (Table 3); however, the thickness of the endometrial stroma was reduced ($p < 0.05$) in ND-treated groups. The myometrium remained thicker in all of the groups treated with different doses of ND (Fig. 2E, H, K, N and Table 3), and the perimetrium was thicker in the groups that received 1.87, 3.75, and 15 mg ND/kg when compared to the control (Table 3).

After the recovery period for 60 days, the endometrium of the rats that received 1.87 and 3.75 mg ND/kg exhibited the same histological aspect to that observed in the control group (Fig. 2C, F, I), but the epithelium height and stromal thickness varied between these groups. At doses of 7.5 and 15 mg ND/kg, the endometrium showed histopathological changes mainly characterized by limited amount of stromal components and presence of glandular cysts (Fig. 2L, O). The epithelium remained thin ($p < 0.05$) in the group treated with 15 mg ND/kg, and endometrial stroma showed reduced thickness in the groups that received 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg comparatively to control group—CD (Table 3). In all ND-treated groups, the myometrium and perimetrium remained thicker after 60-day recovery (Table 3).

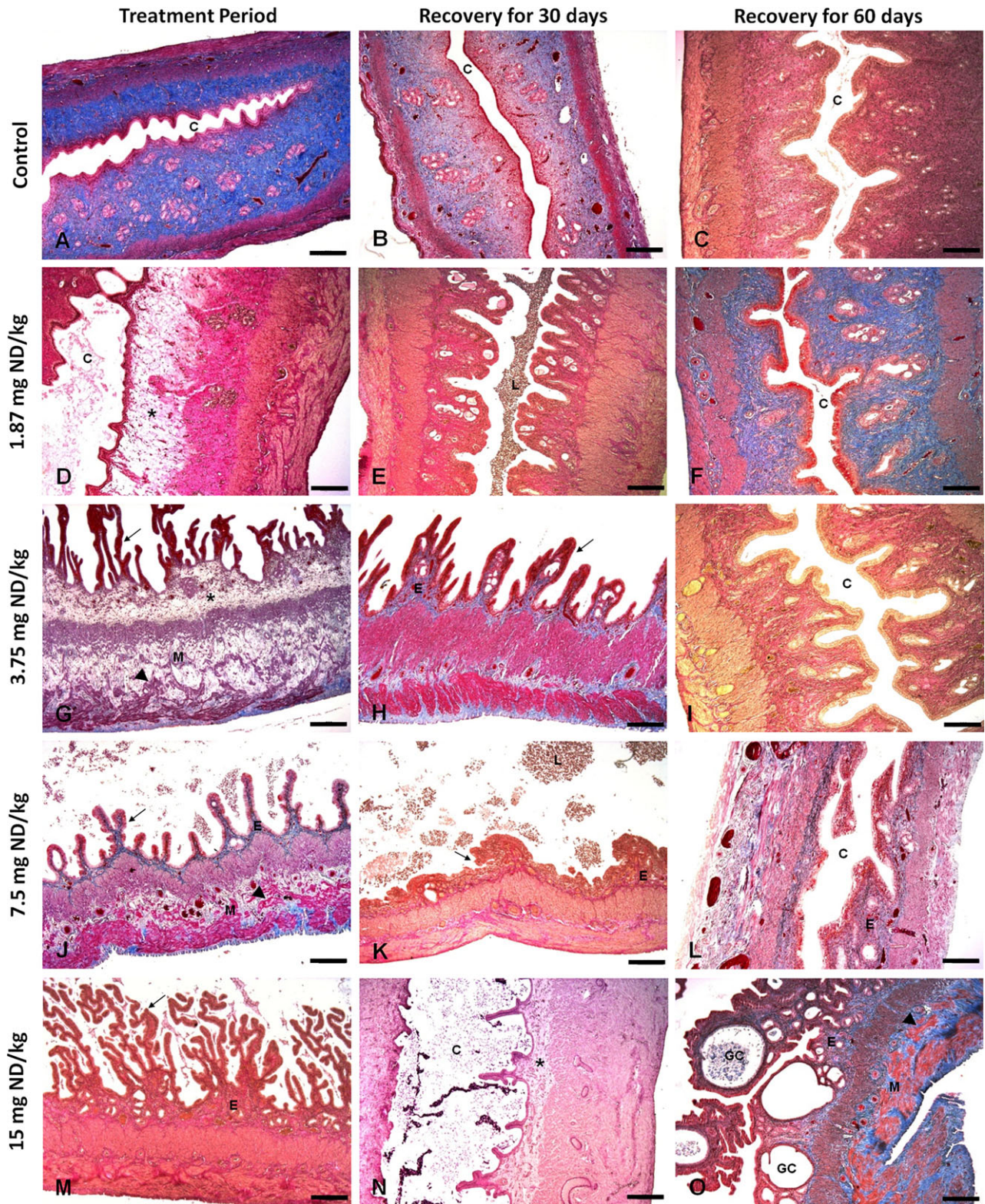


Fig. 2. Photomicrographs of the uterine tissue in ND-treated rats, and after recovery for 30 and 60 days, respectively. Controls (Fig. 2 A, B indicates control in diestrous, and C indicates control in estrous), 1.87 mg ND/kg (Fig. 2 D–F), 3.75 mg ND/kg (Fig. 2 G–I), 7.5 mg ND/kg (Fig. 2 J–L), and 15 mg ND/kg (Fig. 2 M–O). All of the ND-treated groups, regardless of dosage, presented endometrial papillary projections (arrows), stromal edema (asterisk), paucity of endometrial connective tissue (E), and disruption of the muscle fibers (arrowhead) in the myometrium (M). Recovery for 30 and 60 days maintained the pattern of cross-section papillary projections. GC, glandular cysts; C, uterine cavity; L, luminal secretion with polymorphonuclear leukocytes. Mallory's trichrome (A, B, F, G, H, J, L, O); Van Gieson (C, D, E, I, K, M); PAS-H (N). Bar = 300 μ m.

Table 3
Histomorphometric Parameters (μm) Regarding Three Distinct Uterine Layers in Rats from Different Experimental Groups and Periods. Values are Expressed by Using 10 Repetitions ($\mu\text{m} \times 10$)/Animal/Group

Parameters	Experimental groups ($n = 5/\text{group}$)/period				
	Treatment period				
	Diestrous control*	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Luminal epithelium	25.2 \pm 11.3 a	20 \pm 11.3 b	19.7 \pm 10.08 b	16.7 \pm 7.7 c	19.5 \pm 8.6 b
Endometrial stroma	350 \pm 361.4 a	339.3 \pm 167.2 a	308.5 \pm 291 a	142.3 \pm 163.7 b	229.6 \pm 279.3 c
Myometrium	320 \pm 129.2 a	523.7 \pm 283.6 b	585.6 \pm 355.5 b	389.8 \pm 131.5 c	523.1 \pm 236.5 b
Perimetrium	16.4 \pm 10.6 a	32.3 \pm 18 b	23 \pm 17.8 c	19.2 \pm 10.5 a	25.7 \pm 18.6 bc
Post-treatment recovery for 30 days					
Parameters	Diestrous control*	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Luminal epithelium	21.9 \pm 10.1 a	22.5 \pm 8.7 a	24 \pm 9.04 a	24.7 \pm 11.4 a	21.1 \pm 9.05 a
Endometrial stroma	548.1 \pm 569.8 a	142.6 \pm 111 b	174.4 \pm 212.3 b	107 \pm 60.3 c	296.1 \pm 174.5 d
Myometrium	299.1 \pm 145.9 a	530 \pm 209 b	553.3 \pm 128.8 b	413.8 \pm 132.3 c	579.6 \pm 296.2 b
Perimetrium	19.7 \pm 8.7 a	33.3 \pm 20 b	29.6 \pm 20.8 b	19.8 \pm 8.8 a	25.2 \pm 13.9 c
Post-treatment recovery for 60 days					
Parameters	Estrous control**	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Luminal epithelium	30 \pm 14.1 a	36.2 \pm 13.3 b	31 \pm 11 a	30.3 \pm 12.7 a	18.7 \pm 8.4 c
Endometrial stroma	417.2 \pm 305.2 a	316.7 \pm 209.4 ac	179.9 \pm 176.4 c	136.8 \pm 129.5 b	110.7 \pm 155.7 b
Myometrium	298.4 \pm 87.4 a	363.7 \pm 196.2 b	412.6 \pm 205.1 bc	427.5 \pm 236.4 c	490 \pm 371.3 c
Perimetrium	19.7 \pm 11.2 a	29.1 \pm 18.4 b	24.9 \pm 10.7 b	25.2 \pm 15.2 b	25.8 \pm 21.2 b

Within each line, values followed by different letters indicate statistical differences among the groups ($p < 0.05$). Data are expressed as the median \pm interquartile deviation.

*Control group induced to death in the diestrous phase.

**Control group induced to death in the estrous phase.

After the recovery periods, all of the animals showed thicker luminal epithelium compared to the end of dosing period, except the group of 15 mg ND/kg at 60-day recovery (Table 3). The thickness of the endometrial stroma was restored only after 60-day recovery in the group that received 1.87 mg ND/kg. After 60-day recovery, the animals showed reduced myometrium thickness, except the group treated with 7.5 mg ND/kg. Finally, only the groups treated with the lowest and highest doses of ND presented similar thickness of the perimetrium in the three periods of study.

Reproductive and Fetal Parameters

No ND-treated female was fertilized at the end of dosing period or 30 days after last dose due to the persistent diestrous (Table 4). Interestingly, at 60-day recovery after cessation of treatment, only two rats receiving doses of 1.87 mg ND/kg, three rats receiving 3.75 mg ND/kg, and four rats receiving 7.5 mg ND/kg showed sperm in the vaginal smear, confirming mating success. However, no female of groups treated with 3.75 and 7.5 mg ND/kg had developed uterine pregnancy with implantation and/or resorption sites. The group treated with 1.87 mg ND/kg showed a marked pre- and post-implantation loss, suggesting that early embryos development is quite sensitive to low-dose treatment. The external morphology of the fetuses in the ND-treated groups showed no apparent congenital malformation.

DISCUSSION

In this study, the anabolic effect of ND was demonstrated by the increase in BW gain at the end of dosing period, corroborating other previous results (Gerez et al., 2005; Mobini Far et al., 2007; Camargo et al., 2009b). At 30 days after last dose, the anabolic effect promoted by the ND was reduced in all groups probably due to severe changes in BW; however, only the doses of 3.75 and 7.5 mg ND/kg promoted higher BW gain, and unaltered uterine weights. These dosages seem to have no deleterious effects to the body metabolism at the end of dosing period, and at 30 days after last dose. Nevertheless, the exact mechanism(s) by which low- and high-level ND treatment modifies body composition and female reproduction remains a matter of debate. At 60-day recovery, the BW gain was similar in all of the experimental groups. This result is consistent with previous studies reporting a reduced muscle mass within few weeks after the cessation of androgen therapy (Bonetti et al., 2008).

At the end of dosing period, the increase in uterine weight observed with the doses of 3.75, 7.5, and 15 mg ND/kg is probably due to the abundant luminal secretion and histomorphometric changes (hypertrophy of the uterine layers). The influence of synthetic steroid on the uterine weight was described previously (Papacostantinou et al., 2002; Mobini Far et al., 2007; Camargo et al., 2011). At 30 days after ND treatment, the uterine weights were similar to control in diestrous, and remained similar 60 days after last dose. These results

Table 4
Fertility Rates of the Females During the Treatment with Different Doses of ND, and After Recovery for 30 and 60 Days

Parameters	Experimental groups (<i>n</i> = 5/group)/period				
	Treatment period				
	Estrous control	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Copulation rate (%)	100 (5/5)	0	0	0	0
Fertility rate (%)	100 (5/5)	0	0	0	0
Implantation rate (%)	91.6 ± 10.2	-	-	-	-
Live litter size	10.6 ± 1.34	-	-	-	-
Fetal weight (g)	1.68 ± 0.25	-	-	-	-
Pre-implantation loss (%)	8.0 ± 10.2	-	-	-	-
Post-implantation loss (%)	10 ± 13.5	-	-	-	-
Post-treatment recovery for 30 days					
Parameters	Estrous control	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Copulation rate (%)	100 (5/5)	0	0	0	0
Fertility rate (%)	100 (5/5)	0	0	0	0
Implantation rate (%)	83.4 ± 17.2	-	-	-	-
Live litter size	10.2 ± 2.04	-	-	-	-
Fetal weight (g)	1.8 ± 0.19	-	-	-	-
Pre-implantation loss (%)	2 ± 3	-	-	-	-
Post-implantation loss (%)	0 ± 0	-	-	-	-
Post-treatment recovery for 60 days					
Parameters	Estrous control	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Copulation rate (%)	100 (5/5)	40 (2/5)	60 (3/5)	80 (4/5)	0
Fertility rate (%)	100 (5/5)	100 (5/5)	0	0	0
Implantation rate (%)	86 ± 16.1	69.7 ± 23.1	-	-	-
Live litter size	10.4 ± 2.61	9.0 ± 3.0	-	-	-
Fetal weight (g)	1.9 ± 0.09	1.7 ± 0.28	-	-	-
Pre-implantation loss (%)	14.1 ± 16.1	30.2 ± 23.1	-	-	-
Post-implantation loss (%)	0 ± 0	11.0 ± 3.3	-	-	-

Data are expressed as the median ± interquartile deviation. Due to the small number of pregnant females in the group treated with 1.87 mg ND/ kg, it was not possible to establish comparison between the ND-treated and control group.

clearly demonstrated that the uterine weight is able to be faster restored after discontinuing ND treatment than the morphological aspects of the tissue.

The estrous acyclicity promoted by the treatment of ND is widely reported (Clark et al., 2003; Gerez et al., 2005; Mobini Far et al., 2007; Camargo et al., 2009a, 2009b; Bento-Silva et al., 2010; Chuffa et al., 2011), and this effect is related to a disruption of the neuroendocrine functions, in which high levels of exogenous testosterone alter the release of the Follicle stimulating hormone (FSH), Luteinizing hormone (LH), estrogen, and progesterone (Strauss et al., 1985; Gao and Short, 1993; Bronson et al., 1996; Blasberg et al., 1997). The persistence in diestrus found in ND-treated animals and after 30-day recovery indicate that nandrolone is slowly released from the injection site into the blood circulation with a half-life of 6 to 8 days (Van der Vies, 1985), since it is a fat-soluble substance that produces sodium retention by the kidneys before being excreted. The restoration of estrous cycle at 60-day post-treatment recovery occurred in a dose-dependent manner, since the females treated with lower doses (1.87 and 3.75 mg ND/kg) showed regular cycles while those treated with the highest dose (15 mg ND/kg) had persistent diestrus. Therefore, the results evidenced that the re-

covery of reproductive functions, such as estrous cyclicity and pregnancy, was dose- and time-dependent.

This is the first study to describe histopathological and morphometric changes in the uterine tissue arising from different doses of ND and varying with the recovery periods. The lowest dose (1.87 mg ND/kg), which is similar to the therapeutic dose used for treating anemia (allometric scaling for ND treatment, Reagan-Shaw et al., 2007), was able to promote damage to uterine tissue similarly to the highest dose used in the study (15 mg ND/kg). The ND treatment during 15 consecutive days led to several changes in the endometrium, myometrium, and perimetrium layer in a dose-independent manner, indicating that these levels are not safe when administered in therapeutic or supraphysiological doses. Other studies also reported negative effects of ND on uterine tissue after a single dose of steroid (Gerez et al., 2005; Mobini Far et al., 2007; Camargo et al., 2009b; Chuffa et al., 2011), but none has evaluated the uterus under different experimental conditions.

The changes observed in uterine tissue of androgenized females may be related to the progestational effect induced by the drug (Camargo et al., 2011), due to the ability

that nandrolone has to generate progestin-like molecules to be metabolized (Schindler et al., 2003). This effect coupled with the persistent diestrous may have contributed to the endometrial disturbances related to an increased luminal secretion.

The loss of morphological integrity of the myometrium was notable in ND-treated animals, and may result from the action of androgen receptors highly expressed in this layer. According to Camargo et al. (2011), androgen receptors in the myometrium may substantially affect the cells of perimetrium layer in a paracrine way, and it was not prevented after the recovery periods. The evaluation of uterine tissue during the recovery periods showed that ND promoted dose- and time-dependent effects, since the histopathological and morphometric changes remained until the 30 days post-treatment in all groups. Conversely, at 60-day post-treatment recovery, only the higher doses of ND continued to exhibit structural damages to the uterus.

Different doses of ND suppressed the reproductive capacity of females after the treatment period and recovery for 30 days. This may be due to ND-induced perturbation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Blasberg et al., 1997), which resulted in acyclicity and impaired mating. According to Blasberg et al. (1998) and Mobini Far et al. (2007), exogenous androgens inhibit sexual receptivity in animals. In the present study, 60 days after last ND dose, the females were receptive to males since sperm was observed in vaginal smears, except those females receiving the highest dose of ND (15 mg/kg). However, only the females receiving 1.87 mg ND/kg became pregnant. The rats receiving doses of 3.75 and 7.5 mg ND/kg probably did not ovulate because no uterine implantation and/or resorption sites were found. Importantly, a longer recovery time may be required to restore reproductive parameters when high ND doses are administered.

In summary, all of the different doses of ND exhibited the same deleterious effect on uterine histopathology and fertility. Moreover, the recovery periods restored uterine morphology and reproductive capacity after ND treatment in a dose- and time-dependent manner. Although the effects of ND experienced in animals and humans should be considered very carefully, this study is intended to prevent AAS users from irreversible damages during the reproductive age.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to FAPESP—São Paulo Research Foundation for financial support (Processes number 2012/03813-0 and 2012/01747-0).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bahrke MS, Yesalis CE. 2004. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 4:614–620.
- Bento-Silva MT, Martins MCC, Torres-Leal FL, Barros TL, Carvalho ILNF, Carvalho Filho HA, Almeida RFG. 2010. Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. *Braz J Pharm Sci* 46:79–89.
- Blasberg ME, Langan CJ, Clark AS. 1997. The effects of 17 α -methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle. *Physiol Behav* 61:265–272.
- Blasberg ME, Robinson S, Henderson LP, Clark AS. 1998. Inhibition of estrogen-induced sexual receptivity by androgens: role of the androgen receptor. *Horm Behav* 34:283–293.
- Bonetti A, Tirelli F, Catapano A, Dazzi D, Dei Cas A, Solito F, Ceda G, Reverberi C, Monica C, Pipitone S, Elia G, Sapattini M, Magnati M. 2008. Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. *Int J Sports Med* 29:679–687.
- Bronson FH, Nguyen KQ, De La Rosa J. 1996. Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. *Physiol Behav* 59:49–55.
- Camargo ICC, Souza RB, Mesquita SFP, Chuffa LGA, Frei F. 2009a. Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical effort. *Acta Biol Hung* 60:253–261.
- Camargo ICC, Gaspar ALC, Frei F, Mesquita SFP. 2009b. Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 31:453–460.
- Camargo ICC, Gênova TC, Machado MCP, Frei F, Mesquita SFP. 2011. Administração experimental de esteroide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. *Biosci J* 27: 656–665.
- Cannavò S, Curtò L, Trimarchi F. 2001. Exercise-related female reproductive dysfunction. *J Endocrinol Investig* 24:823–832.
- Chuffa LGA, Souza RB, Frei F, Mesquita SFP, Camargo ICC. 2011. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anatomical Rec* 294:335–341.
- Clark AS, Fast AS. 1996. Comparison of the effects of 17 α -methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav Neurosci* 110:1478–1486.
- Clark AS, Kelton MC, Whitney AC. 2003. Chronic administration of anabolic steroids disrupts pubertal onset and estrous cyclicity in rats. *Biol Reprod* 68:465–471.
- Evans NA. 1997. Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. *Br J Sports Med* 31:54–58.
- Fermo RS, Rego JNI, Fraquini JVM, Andrade TU. 2008. Efeito da suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em ratos. *Rev Eletron Farm* 5:111–121.
- Gao Y, Short RV. 1993. Use of an oestrogen, androgen or gestagen as a potential chemosterilant for control of rat and mouse populations. *J Reprod Fertil* 97:39–49.
- Gerez JR, Frei F, Camargo ICC. 2005. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception* 72:77–80.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B* 80:84–97.
- Hoffman JR, Ratamess NA. 2006. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? *J Sports Sci Med* 5:182–193.
- Iriart JAB, Andrade TM. 2002. Body-building, steroid use, and risk perception among young body-builders from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil. *Toxicol Appl Pharmacol* 18:71–81.
- Jocelyn H, Bruce-Gregorios MD. 1974. *Histopathologic techniques*. Quezon City, Philippines: JMC Press Inc.
- Kam PCA, Yarrow M. 2005. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia* 60:685–692.
- Karbalay-Doust S, Noorafshan A. 2006. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. *Micron* 37:617–623.
- Kicman AT. 2008. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol* 154:502–521.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609–614.
- Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OH, Perez SE, Nakagaki WR, Carvalho HF, Selistre-Araujo HS. 2010. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *Scand J Med Sci Sports* 21:e91–e99.
- Mobini Far HR, Agren G, Lindqvist AS, Marmendal M, Fahlke C, Thiblin I. 2007. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their

- uterus and a reduction in reproductive capacity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 131:189–197.
- Papaconstantinou AD, Umbreit TH, Goering PL, Brown KM. 2002. Effects of 17 alpha-methyltestosterone on uterine morphology and heat shock protein expression are mediated through estrogen and androgen receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82:305–314.
- Perry PJ, Lund BC, Deninger MJ, Kutscher EC, Schneider J. 2005. Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey of drug utilization. *Clin J Sport Med* 15:326–330.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661.
- Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JHH. 2003. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas Eur Menopause J* 46S1:S7–S16.
- Shahidi NT. 2001. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic androgenic steroids. *Clin Ther* 23:1355–1390.
- Strauss RH, Liggett MT, Lanese RR. 1985. Anabolic steroid use and perceived effects in ten weight-trained women athletes. *JAMA* 253:2871–2873.
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas Neto AG. 2003. *Manual de técnicas para Histologia normal e patológica*. 2nd ed. Barueri, SP: Manole.
- Van der Vies J. 1985. Implications of basic pharmacology in the therapy with esters of nandrolone. *Acta Endocrinol Suppl* 271:38–44.
- Wato E, Asahiyama M, Suzuki A, Funyu S, Amano Y. 2009. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 9) Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) in female rats. *J Toxicol Sci* 34:101–109.
- Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray E Jr. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci* 65:71–86.

CAPÍTULO II

Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods

Vinícius Augusto Simão, Larissa Berloff Belardin, Gabriel Adan Araújo Leite, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Isabel Cristina Cherici Camargo

Trabalho publicado on-line no periódico *International Journal Of Experimental Pathology*, doi: 10.1111/iep.12144. 2015.



ORIGINAL ARTICLE

Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods

Vinícius Augusto Simão*, Larissa Berloff Belardin*, Gabriel Adan Araújo Leite*, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa† and Isabel Cristina Cheric Camargo*

*Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences and Letters, Univ Estadual Paulista – UNESP, Assis, Brazil and

†Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Brazil

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

doi: 10.1111/iep.12144

Received for publication: 9 February 2015

Accepted for publication: 22 July 2015

Correspondence:

Isabel Cristina Cheric Camargo
Department of Biological Sciences
Faculty of Sciences and Letters
Univ Estadual Paulista – UNESP
19806-900 Assis, SP, Brazil
Tel.: +55 18 3302 5852
Fax: +55 18 3302 5849
E-mail: camargo@assis.unesp.br

SUMMARY

This study tested the hypothesis that different doses of nandrolone decanoate (ND) will cause changes in the estrous cycle and ovarian tissue of adult rats; and investigated the duration of the recovery period that is sufficient to restore the damage in the animals treated with different doses. Wistar rats were treated with ND at doses of 1.87, 3.75, 7.5 and 15 mg/kg body weight, or received mineral oil (control group) for 15 days, subcutaneously. All animals were divided into three groups according to the treatment periods: (i) ND treatment for 15 days; (ii) ND treatment followed by a 30-day recovery; and (iii) ND treatment followed by a 60-day recovery. Estrous cycle was monitored daily, and at the end of each period, the animals were euthanized for histopathological analysis. During ND treatment and after 30-day recovery, all animals exhibited persistent diestrus. After a 60-day recovery, persistent diestrus was only maintained in the group that had received the highest dose. Ovarian weight was decreased significantly after the 30-day recovery, regardless of ND doses, compared with the control group. There was a reduction ($P < 0.05$) in the number of corpora lutea and antral and growing follicles, in contrast to an increase ($P < 0.05$) in atretic follicles in a dose- and time-dependent manner. Remarkable histopathological changes occurred in the ovaries of all ND-treated groups. In conclusion, the different doses of ND caused changes in the estrous cycle and ovarian tissue of rats, and recovery periods (30 and 60 days) were insufficient to completely restore the damage in the animals treated with the highest dose.

Keywords

estrous cycle, nandrolone decanoate, ovarian histopathology, rats, recovery period

Anabolic androgenic steroids (AAS) are substances synthesized from testosterone or one of their derivatives, with anabolic or androgenic effects, depending on the target tissue (Lise *et al.* 1999; Bahrke & Yesalis 2004). The prescription and commercialization of these drugs are strictly controlled in many countries. However, AAS have been used indiscriminately by athletes and non-athletes to increase muscle mass and resistance in a short time (Iriart *et al.* 2009).

Anabolic androgenic steroids are clinically indicated for the treatment of chronic diseases associated with the catabolic state of the patient, in conditions of AIDS, chronic

obstructive pulmonary disease, hepatic or renal failure, cancer, and in cases of burns and postsurgical recovery (Karbalay-Doust & Noorafshan 2006; Kicman 2008). They are also recommended for androgen replacement therapy after menopause (Arlt 2006), and during age-related sarcopaenia (Evans 2004).

Among the AAS derivatives, nandrolone decanoate (ND) is the most commonly used injectable steroid (Boff 2010). Usually, AAS are administered at supraphysiological doses (Fermo *et al.* 2008), which are fivefold to 29-fold higher than the dose recommended for the hormonal replacement

(Perry *et al.* 2005) or reach up to 100 times the therapeutic dose recommended for the treatment of various diseases (Clark & Fast 1996).

Over the past decade, the abusive use of AAS by women has increased significantly (Bahrke & Yesalis 2004; Thiblin & Petersson 2004). In women, the side effects may include deepening of the voice, growth of body hair, atrophy of the breasts, aggressiveness, menstrual irregularity and clitoris hypertrophy (Maravelias *et al.* 2005; Hoffman & Ratamess 2006; Kicman 2008), with these alterations being dose- and time dependent (Silva *et al.* 2002; Cunha *et al.* 2004; Kam & Yarrow 2005; Bonetti *et al.* 2008). Moreover, changes in gonadal function such as delayed puberty, luteal-phase deficiency, oligo-amenorrhea or anovulation may occur in addicted women (Cannavò *et al.* 2001). Unfortunately, some of these changes are irreversible after cessation of AAS administration (Kam & Yarrow 2005).

Although deleterious effects promoted by AAS are well understood, few studies have focused attention to their effects on female reproductive morphological parameters. The estrous cycle is a periodic physiologic process, with an average duration of 4.5 days, ranging from 3.5 to 5.5 days in Wistar rats (Paccola *et al.* 2013), and can be influenced by endogenous or exogenous factors that commonly express a change in normal morphology of the reproductive tract or a disturbance in the duration of particular phases of the cycle (Westwood 2008). We have recently reported that ND causes changes in the estrous cycle (Gerez *et al.* 2005; Camargo *et al.* 2009a; Chuffa *et al.* 2011b), histopathological alterations in the ovaries and uterus (Gerez *et al.* 2005; Camargo *et al.* 2009a, 2014; Chuffa *et al.* 2011b) and damage to the fertility (Camargo *et al.* 2009b; Belardin *et al.* 2014). However, no study has evaluated the dose-dependent effect of the ND on ovarian tissue and whether this effect can be reversed after discontinuing steroid treatment.

Therefore, we aimed to investigate the effects of different doses of ND on estrous cycle and ovarian tissue of rats, in the post-treatment (15 days) and postrecovery periods (30 and 60 days). This study brings novel information regarding the reversibility of some effects promoted by ND in the reproductive cycle and ovaries.

Materials and methods

Animals

Ninety adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), 12 weeks old, weighing approximately 250 g, were obtained from the Univ. Estadual Paulista (UNESP- Botucatu, Brazil) and kept in appropriate cages at the Central Biotherium of the Faculty of Sciences and Letters (UNESP- Assis, Brazil). The females were housed in polypropylene cages (43 cm × 30 cm × 15 cm) with laboratory-grade pine shavings as bedding and also maintained under controlled room temperature (23 ± 1°C) and lighting conditions (12-h L, 12-h D photoperiod, lights switched on at 7 a.m.). Water and commercial diet (Nuvital™) were offered *ad libitum*.

The experimental protocol followed the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Ethical Committee for Animals Use (Permit number: 005/2011, August 31).

Drug

Nandrolone decanoate (17β-hydroxy-19-nor-4-androstene-3-one) was purchased from Schering-Plough Laboratory (São Paulo, Brazil), under the name of Deca Durabolin™. It is an injectable solution, containing 50 mg of the androgen, available as oily solution (Marqueti *et al.* 2010).

Experimental design

Females with regular estrous cycles were weighed and randomly divided into six groups (n = 15/group): ND-treated groups at doses of 1.87 mg/kg body weight (b.w.), 3.75 mg/kg b.w., 7.5 mg/kg b.w. and 15 mg/kg b.w.; CE group: control group euthanized in estrus phase; and CD group: control group euthanized in diestrus phase. Both CE and CD groups received subcutaneous (s.c.) injections of 0.1 ml of mineral oil (NP-35, Anidrol, São Paulo, Brazil) as vehicle. The ND-treated animals received a daily s.c. injection of ND diluted in vehicle for 15 consecutive days. The first injection was administered at the estrus phase of the cycle in all animals. The CD group was used in this study based on previous reports that AAS treatment promotes persistent diestrus (Camargo *et al.* 2009a,b; Bento-Silva *et al.* 2010; Chuffa *et al.* 2011b). In this regard, the evaluation of ovarian tissue was carried out in a specific stage of the estrous cycle that androgenized females persisted or maintained for a long time during the experimental period. Then, all data obtained from animals displaying estrus-phase prolongation were compared with CE group, and data obtained from animals displaying persistent diestrus were compared with CD group.

Doses of 7.5 and 15 mg ND/kg were selected based on previous studies in animals (Blasberg *et al.* 1997; Mobini Far *et al.* 2007; Camargo *et al.* 2011) and mimic the conditions generally employed by non-therapeutic users of AAS (ranging from 200 to 3200 mg/week; Evans 1997). Doses of 1.87 and 3.75 mg ND/kg were used to evaluate the effects of doses employed in various treatments (ranging from 50 to 200 mg/week; Evans 1997) or lowest doses than physiologic replacement doses (ranging from 25 to 600 mg/week; Bhasin *et al.* 2005).

Following the treatment period, each experimental group was divided according to the three periods of the study (n = 5 rats/group/period, Figure 1a–c): ND-treated animals receiving daily s.c. injections for 15 consecutive days (a), and treatment with ND for 15 days followed by recovery for 30 days (b), and for 60 days (c). At the end of each period, the females who had regular estrous cyclicity were euthanized in estrus phase, while the acyclic females were euthanized at the cycle phase wherein persisted. For both cases, the ovaries were collected and processed for histopathological analysis.

Assessment of estrous cycle

During ND-treatment and recovery periods, the estrous cycle was monitored daily by cytological examination (vaginal swabs, Marcondes *et al.* 2002). The time of collection was fixed at 9 a.m. (Chuffa *et al.* 2011a,b, 2013). Each slide containing cells from the vaginal epithelium was analysed under a light microscope (Olympus CX31 RBSFA, Tokyo, Japan) at 10× and 25× magnifications. The phases of the estrous cycle were identified as follows: (i) proestrus, consisting of clusters of round, nucleated epithelial cells; (ii) estrus, with predominance of cornified cells; (iii) metaestrus, consisting of a combination of leucocytes and cornified epithelial cells; (iv) diestrus, with predominance of leucocytes (Goldman *et al.* 2007).

Histopathological analysis

After each period (ND-treatment, 30-day recovery and 60-day recovery), the females displaying regular or irregular estrous cycles were weighed and euthanized with an overdose of the anaesthetic sodium thiopental (Thiopentax™, Cristalia, São Paulo, Brazil), via intraperitoneal injection. The ovaries were collected and weighed, and the relative weights were obtained (organ weight/final body weight × 100, expressed in g/100 g b.w.).

The tissues were fixed in Bouin's solution, dehydrated in ethanol solutions and clarified in xylene for paraffin embedding (Paraplast Labware-Oxford, St. Louis, MO, USA). The blocks were sliced into 5-µm-thick sections in a RM2125 LEICA microtome (Germany) and then stained with haematoxylin and eosin (HE), Mallory's Trichromic, Van Gieson and Orcein, for distinguishing cellular from extracellular matrix components in ovarian tissue during histopathological examination. All of the histological samples were handled in a blinded fashion. Finally, the slides were analysed and images captured with a digital photomicroscope (Scope A1-Axio coupled with video camera AxioCam ICC3 and digitalized by the software AXIO VISION, version 4.7.2; Carl Zeiss, Jena, Germany).

Follicular score and morphometric analysis

The identification of follicles subtypes was based on the classification proposed by Pedersen and Peters (1968), as presented by Plowchalck *et al.* (1993). In each ovary (10 sections/rat/group), the growing, antral and atretic follicles, and corpora lutea were counted. The criterion for the identification of atretic follicles was based on the presence of three characteristics: pyknotic nuclei in the antrum, involution of oocyte and thin granulosa layer. Measurements of the area of antral and atretic follicles, and corpora lutea were obtained using a Zeiss Scope A1-Axio microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) connected to an AxioCam ICC3 camera, and the digitalized images were obtained by the image analyser AXIO VISION version 4.7.2.

Immunohistochemistry

Ovarian sections (n = 5/group/period) were deparaffinized in xylene based on the areas previously identified during the morphological characterization. Tissue sections were microwaved (700–800 W) while immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0, for antigen retrieval. After blocking endogenous peroxidase activity, the tissue was incubated with 3% bovine serum albumin (BSA, 3%) for 1 h to avoid non-specific binding. Subsequently, the ovarian sections were incubated in a humid chamber overnight at 4°C with anti-AR and anti-inhibin A primary rabbit polyclonal antibody (dilution 1:100, ab7970; Abcam, Cambridge, MA, USA). After immunoreactions, the slides were washed in TBS-T buffer and incubated with secondary antibody (Polymer Anti-Mouse IgG or Anti-Rabbit – DAKO® CYT) at room temperature for 1 h. Then, the slides were reacted with chromogen diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 5 min. Then, sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were made by omitting the primary antibody. The results were analysed under a Zeiss Axiophot II microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) based on the levels of staining intensity as absent, weak, moderate and strong reaction.

Immunofluorescence assays

Ovarian tissues were washed with phosphate-buffered saline (PBS; sodium chloride, potassium chloride, dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate), fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized with PBS at room temperature (RT). Non-specific binding sites were blocked with 1% BSA for 60 min. The samples were incubated with the anti-inhibin A primary rabbit polyclonal antibody (dilution 1:100, ab7970; Abcam) overnight at 4°C, followed by a secondary polyclonal anti-rabbit IgG conjugated to FITC (1:200, sc-2012; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at RT. Nuclei were stained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 5 min) at RT. Primary and secondary antibodies were diluted in blocking buffer (1% BSA). For negative immunolabelling, no primary antibody was added. The immunopositive cells were analysed using a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot II, Oberkochen, Germany) at 40× magnification (immunofluorescence: excitation 590 nm, emission filter 650 nm) and for DAPI staining (excitation 365 nm, emission filter 435–485 nm). The fluorescence in the merged images was performed using IMAGE J software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Statistical analysis

The data were analysed by parametric analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, or by nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Student–Newman–Keuls

test, according to the characteristics of each variable. The results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or median \pm interquartile deviation. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using GRAPHPAD PRISM software, version 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

Results

Estrous cycle

Nandrolone decanoate-treated females at different dose levels presented an increase ($P < 0.05$) in the number of days in diestrus during the treatment period (Figure 2a), compared with control group. All ND-treated groups remained at diestrus during the 30-day recovery period (Figure 2b). Females treated with lower doses (1.87 and 3.75 mg ND/kg) exhibited diestrus for 52 and 50 days, respectively, during the 60-day recovery period (Figure 2c). At the end of this period, the rats restored the cycle, but irregularly. The group treated with 7.5 mg ND/kg remained in diestrus until the 58th day and thereafter restored estrus phase. Due to estrous cycle restoration, these groups (1.87, 3.75 and 7.5 mg ND/kg) were euthanized in the estrus phase at the end of 60-day recovery period. Persistent diestrus was only maintained through the 60-day recovery period at the 15 mg ND/kg dose level (Figure 2c).

Ovarian histopathology

A summary of the most common ovarian histopathological features in ND-treated groups is shown in Table 1. During the treatment period, the ovarian histopathology showed that ND-treated groups (Figure 3d,g,j,m) exhibited several atretic follicles, evidenced by a large antrum, a thin granulosa layer and cellular debris within the antrum. This histopathological change still remained after recovery for 60 days in the highest dosages (Table 1). The control group (Figure 3a) presented follicles in various stages of development and mature corpora lutea. Notably, the group treated with 1.87 mg/kg had ovaries with anomalous follicles characterized by seminiferous tubule-like structures, devoid of oocyte, containing Sertoli cells (Figure 5a). These cells presented polymorphonuclear aspect with prominent nucleolus, and abundant and pallid cytoplasm. Moreover, this group exhibited fibrous cortex during the post-treatment recovery for 30 days (Table 1). In the group treated with 7.5 mg/kg, a marked vasodilation and vascular congestion were common in the medulla, along with abundant interstitial tissue in the cortex (Figure 3j). The only exception was the post-treatment recovery for 60 days (Table 1).

Interestingly, deleterious effects promoted by ND in ovaries were intensified after 30 days of recovery (Table 1, Figure 3). There was absence of developing follicles and corpora lutea, ovarian atrophy and abundant interstitial tissue in both cortex and medulla (Figure 3e,h,k,n). Epithelial

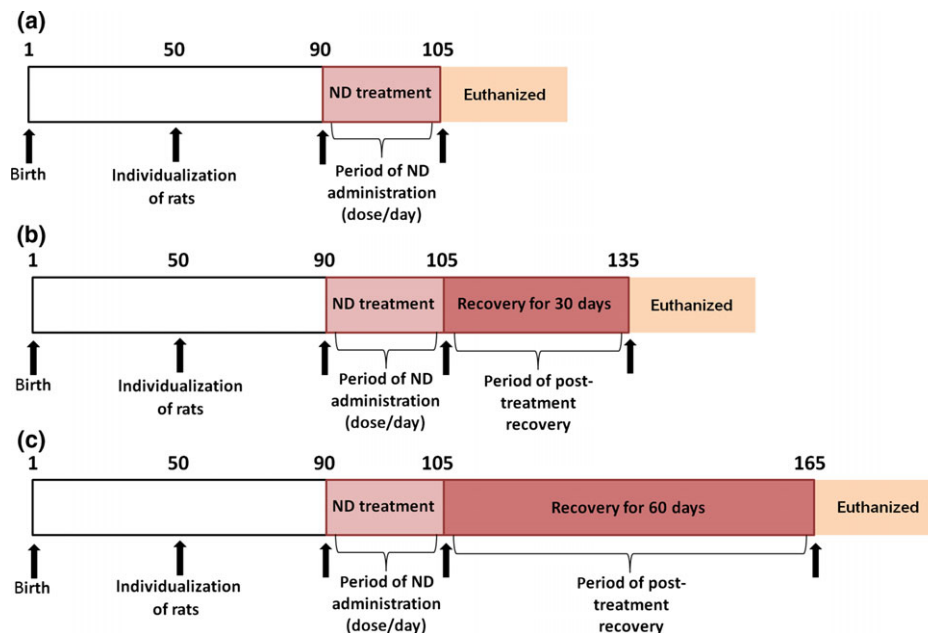


Figure 1 Chronological schedule for the experimental design in days. (a) At 90 days of age, five (5) rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg/kg) were assigned to the end of the dosing period (15 days) and euthanized. (b) Five (5) rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5 and 15 mg/kg) received the respective treatment for 15 days and were maintained without further treatment into the 30-day recovery period followed by euthanasia. (c) Five (5) rats per dose level (1.87, 3.75, 7.5, and 15 mg/kg) received the respective treatment for 15 days and were maintained without further treatment into the 60-day recovery period followed by euthanasia.

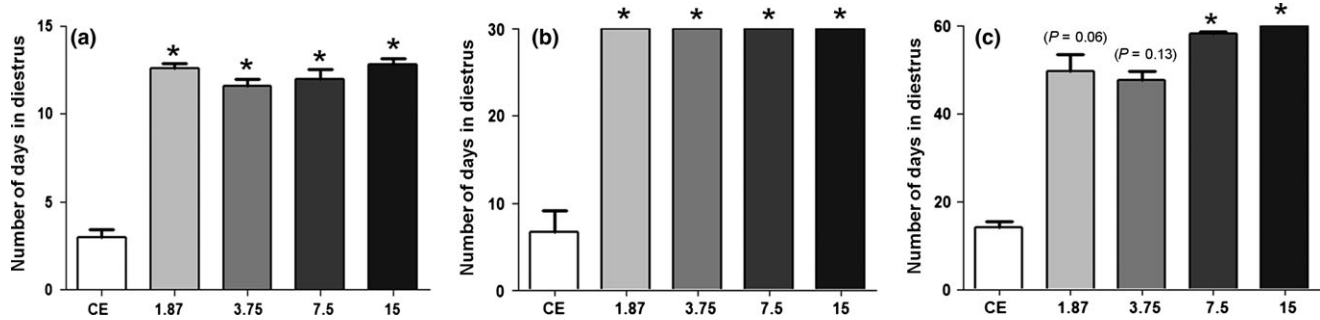


Figure 2 Number of days in diestrus in the nandrolone decanoate (ND)-treated groups (1.87, 3.75, 7.5 and 15 mg/kg) after the treatment period (a), 30-day recovery period (b) and 60-day recovery period (c). Control group with regular cycles was euthanized in the estrus phase (CE). Histograms with an asterisk show significant differences ($P < 0.05$) among the ND-treated group and CE group. Nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Student–Newman–Keuls test. Data are expressed as the median and interquartile deviation.

cysts, characterized by an irregular shape with columnar to cuboidal epithelium (Figure 4a), were present in the fibrous stroma of all animals. Atypical areas of fibrous or elastic tis-

Table 1 Summary of the relevant ovarian histopathological features in the nandrolone decanoate (ND)-treated groups in each period (treatment period and post-treatment recovery for 30 and 60 days)

Histopathological features	Experimental groups (n = 5/group/period)			
	Treatment period			
	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Atretic follicles	X	X	X	X
Vasodilation	—	—	X	—
Abundant interstitial tissue	—	—	X	—
Ovarian atrophy	—	—	—	—
Fibrous stroma	—	—	—	—
Anomalous follicles	X	—	—	—
Epithelial cysts	—	—	—	—
Post-treatment recovery for 30 days				
Atretic follicles	X	X	X	X
Vasodilation	—	—	X	—
Abundant interstitial tissue	X	X	X	X
Ovarian atrophy	X	X	X	X
Fibrous stroma	X	X	X	X
Anomalous follicles	X	X	X	X
Epithelial cysts	X	X	X	X
Post-treatment recovery for 60 days				
Atretic follicles	—	—	X	X
Vasodilation	—	—	—	—
Abundant interstitial tissue	X	X	X	X
Ovarian atrophy	—	—	—	X
Fibrous stroma	—	—	—	X
Anomalous follicles	X	—	X	X
Epithelial cysts	—	—	X	X

(X) Presence; (—) Absence.

sue (Figure 4b,d) showed degenerative aspects in the surrounding stroma, with vacuolated (Figure 4b) and undifferentiated cells (Figure 4c). Furthermore, there was an increase in vascularization of these areas (Figure 4c). Seminiferous tubule-like structures were observed in all ND-treated groups.

After 60 days of recovery, the animals treated with lower doses of ND (1.87 and 3.75 mg/kg) exhibited corpora lutea and follicles at various stages of development or atresia (Figure 3f,i), similar to the controls (Figure 3c). Conversely, the animals treated with higher doses of ND (7.5 and 15 mg/kg) had absence of corpora lutea and lack of healthy follicles (Figures 3l,o). Ovarian atrophy, fibrosis and abundant interstitial tissue were predominant in the stroma of animals treated with 15 mg/kg (Table 1, Figure 3o). Anomalous follicles, characterized by seminiferous tubule-like structures, were scarce in the animals receiving doses of 1.87, 7.5 and 15 mg/kg, and none was reported in the animals treated with 3.75 mg/kg.

After ND treatment and 30 days of recovery period, the androgen receptor (AR) was strongly marked in the nucleus of Sertoli cells of the anomalous follicles (Figure 5b), whereas AR immunoreaction was weak to moderate after 60 days of recovery period (Figure 5b, detail), regardless of ND-dose level. The immunoreaction for inhibin-A (Figure 5c) was strong in Sertoli cells in all of the ND-treated groups, after ND-treatment and recovery periods. Immunofluorescence assay confirmed a positive reactivity for inhibin-A in the cytoplasm of Sertoli cells (Figure 5d).

Ovarian analysis

Ovarian weight, follicular score and morphometrical data are shown in Table 2. The mean ovarian weights were similar ($P > 0.05$) in all ND-treated groups during the treatment period (Table 2). However, there was a reduction in the organ weight ($P < 0.05$) after 30 days of recovery, when compared to CD group. After 60 days of recovery, the mean ovarian weight of the groups treated with lowest doses (1.87 and 3.75 mg/kg) was similar ($P > 0.05$) to that of CE

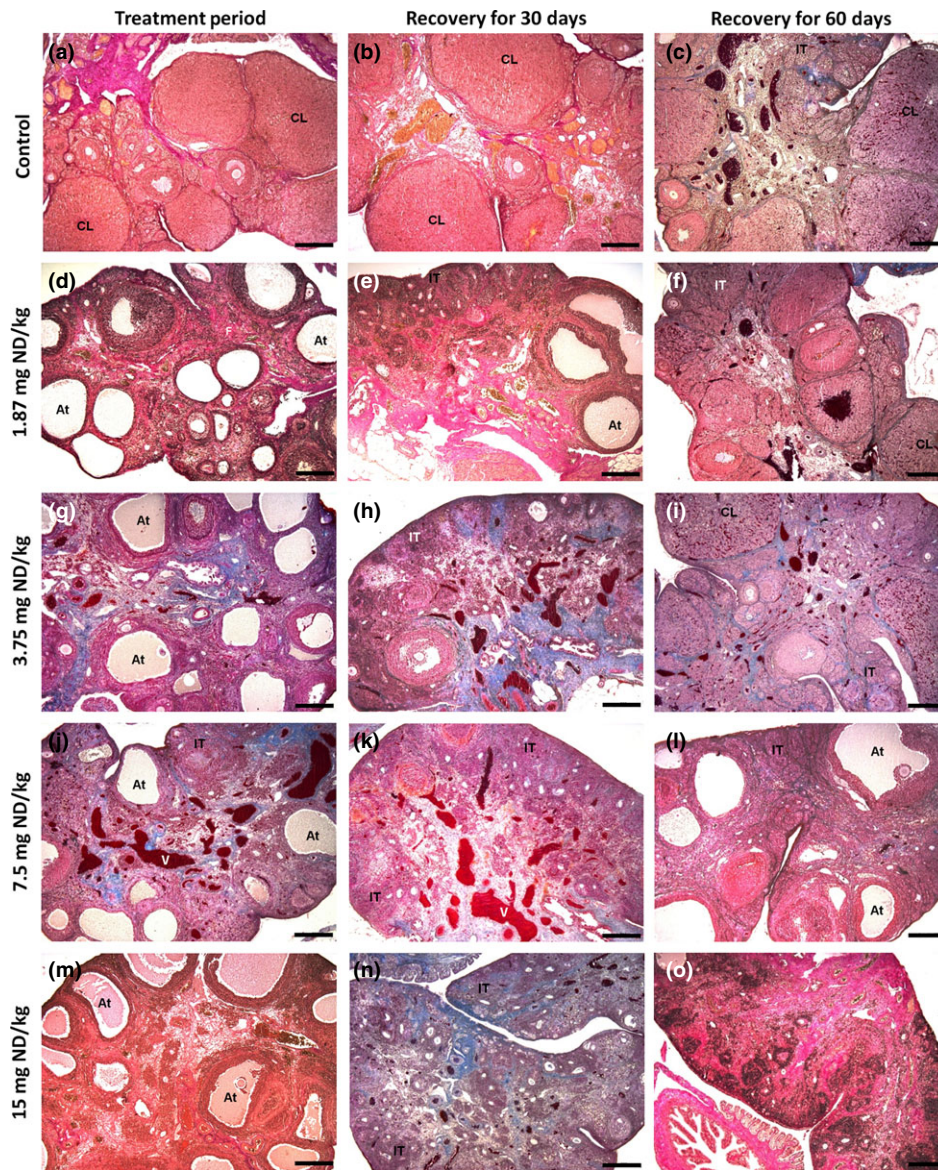


Figure 3 Photomicrographs of the ovaries in the different groups after the nandrolone decanoate (ND)-treatment period and recovery for 30 and 60 days. Figures (a and b) represent the control group euthanized in the diestrus phase (CD); Figure (c) represents the control group euthanized in the estrus phase (CE); and d–o represent ND treatment at 1.87 mg/kg (d, e, f), 3.75 mg/kg (g, h, i), 7.5 mg/kg (j, k, l) and 15 mg/kg (m, n, o). Note the follicular atresia (At) in all ND-treated groups. In the 7.5 mg/kg group (j, k), note the medullary vasodilatation (v). After 30 days of recovery, the ovaries exhibited atrophy and abundant interstitial tissue (IT). After 60 days of recovery, the groups treated with 1.87 and 3.75 mg/kg (f, i, respectively) contained corpora lutea (CL). The group treated with 15 mg/kg (o) showed ovarian atrophy and loss of follicular units. Stained with Mallory's trichrome (c, f, g, h, i, j, k, l, n) and Van Gieson (a, b, d, e, m). Bar = 200 μ m.

group, whereas in the groups treated with highest doses (7.5 and 15 mg/kg), the weight remained reduced.

During the ND treatment, the number and area of corpora lutea were decreased ($P < 0.05$) in the groups that received 1.87, 3.75 and 7.5 mg/kg. These structures were absent after 30 days of recovery, and in longer recovery period, the groups treated with 1.87 and 3.75 mg/kg restored the number and area of corpora lutea, while in the highest doses (7.5 and 15 mg/kg), the corpora lutea remained absent (Table 2).

There was a decrease in the number of antral follicles during ND treatment and after the recovery periods in a dose-dependent manner (Table 2). The area of these follicles remained reduced in the groups treated with 1.87, 3.75 and 7.5 mg/kg after 60 days of recovery (Table 3). The number of growing follicles was reduced ($P < 0.05$) in the ND-treated groups, except the 3.75 mg/kg group (Table 2). At 30-day recovery, all groups still had few growing follicles, and a 60-day recovery was sufficient to increase growing follicles in the groups that received the

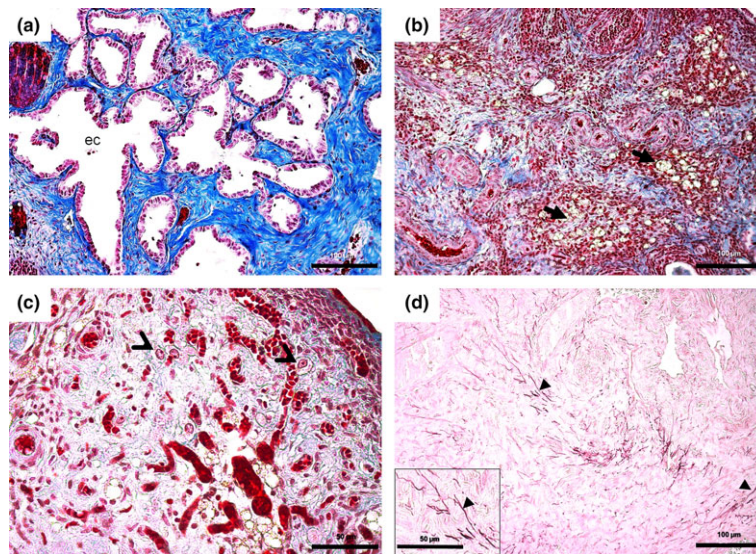


Figure 4 Details of the ovarian histopathological changes in the different nandrolone decanoate (ND)-treated groups. Figure (a) shows epithelial cysts (ec) with irregular outlines and cuboid or columnar epithelium, surrounded by fibrous tissue (present in all groups after 30 days of recovery). Figure (b) shows areas of stromal degeneration containing vacuolated cells (arrows), surrounded by fibrous tissue. Figure (c) shows undifferentiated cells (thin arrow head) located in a notably vascular stroma. Figure (d) shows highlighted elastic fibres (arrow head, in detail) in the midst of a fibrous stroma in animals treated with 15 mg/kg after 60 days of recovery. Bar = 50 µm (c, d-detail), 100 µm (a, b, d). Stained with Mallory's trichrome (a–c) and Orcein (d).

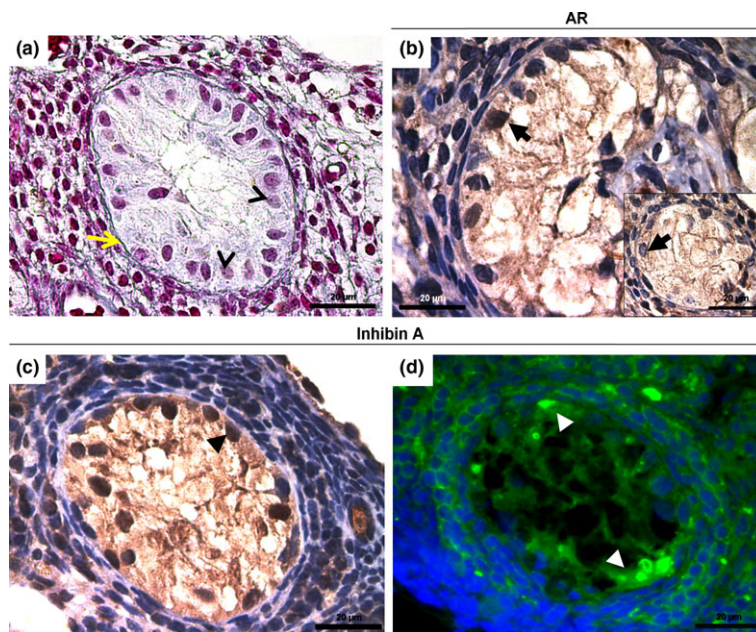


Figure 5 Histological sections of seminiferous tubule-like structures containing Sertoli cells in the androgenized groups. Figure (a) shows polymorphonuclear cells with prominent nucleolus (thin arrow head) and abundant cytoplasm within the anomalous follicle devoid of oocyte and delineated by a continuous basal membrane (yellow arrow). Figure (b) shows an intense AR immunoreaction in the Sertoli cells (arrow), after treatment period. In detail, observe the moderate nuclear AR immunostaining (arrow) after 60 days of recovery. Figure (c) indicates the nuclear staining for inhibin-A (arrow head). This result occurred after the treatment and recovery periods. Figure (d) shows the immunopositive cells for inhibin-A (FITC, arrow head). Immunoreaction of inhibin-A appears in the inner and surrounding cells of anomalous follicle. Bars = 20 µm. Stained with Mallory's trichrome (a) and haematoxylin (b, c).

lowest doses (1.87 and 3.75 mg/kg). Despite no difference found in the atretic follicle area, there was an increased number of atretic follicles in ND-treated groups (Tables 1

and 2). At 30-day recovery, the number of atretic follicles in androgenized groups was similar ($P > 0.05$) to the control group (Table 2). The follicle area was lower after a

Table 2 Ovarian weight (g/100 g b.w.) and number of corpora lutea and antral, growing and atretic follicles in the different nandrolone decanoate (ND)-treated groups and periods (treatment period and post-treatment recovery for 30 and 60 days)

Parameters	Experimental groups (n = 5/group/period)				
	Treatment period				
	Diestrus control [†]	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Ovarian weight*	0.035 ± 0.003 a	0.027 ± 0.003 a	0.028 ± 0.005 a	0.027 ± 0.004 a	0.035 ± 0.010 a
Corpora lutea	10 ± 3.7 a	1 ± 1.7 b	6 ± 2 c	5 ± 3 c	10 ± 4.7 a
Antral follicles	8 ± 3 a	5 ± 4.7 b	11 ± 4 c	4.5 ± 3.7 b	6.5 ± 4.7 ab
Growing follicles	6 ± 3 a	0 ± 1 b	4 ± 2.75 a	1 ± 1.75 b	2.5 ± 2 c
Atretic follicles	5 ± 7 a	20 ± 11 b	16.5 ± 5.7 bd	11.5 ± 14.2 cd	13 ± 11.5 cd
Post-treatment recovery for 30 days					
Ovarian weight*	0.030 ± 0.003 a	0.017 ± 0.001 b	0.018 ± 0.002 b	0.019 ± 0.003 b	0.020 ± 0.003 b
Corpora lutea	16.50 ± 4.5 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
Antral follicles	6 ± 4 a	1 ± 2 b	4 ± 3 a	2.5 ± 3 c	4 ± 3 a
Growing follicles	4 ± 2.7 a	0 ± 1 b	2 ± 2 c	1 ± 2 de	0.5 ± 1 e
Atretic follicles	6.5 ± 6 a	5.5 ± 7.5 a	5.5 ± 3.7 a	5 ± 7 a	4 ± 9 a
Post-treatment recovery for 60 days					
Estrus control [‡]					
Ovarian weight*	0.035 ± 0.007 a	0.030 ± 0.007 ab	0.036 ± 0.004 a	0.021 ± 0.005 bc	0.014 ± 0.003 c
Corpora lutea	11.5 ± 6.5 ab	8 ± 8 a	13 ± 2.7 b	0 ± 0 c	0 ± 0 c
Antral follicles	4 ± 5.7 a	4 ± 3 a	4 ± 2 a	1 ± 1 b	0 ± 1 b
Growing follicles	2 ± 2 ac	1 ± 1 ab	3 ± 4.7 c	1 ± 2 b	0 ± 0 b
Atretic follicles	5 ± 6 ac	5 ± 6.7 ab	2 ± 2 b	4 ± 6 c	1 ± 2 b

Data are expressed as the mean ± SD. *Data are expressed as the median ± interquartile deviation. In the same line, values followed by different letters indicate statistical differences among the groups ($P < 0.05$). [†]Control group in the diestrus phase. [‡]Control group in the estrus phase.

Table 3 Measurements of area (mm²) of corpora lutea and antral and atretic follicles in the different nandrolone decanoate (ND)-treated groups and periods (treatment period and post-treatment recovery for 30 and 60 days)

Parameters	Experimental groups (n = 5/group/period)				
	Treatment period				
	Diestrus control*	1.87 mg/kg	3.75 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg
Corpora lutea	0.60 ± 0.56 a	0.11 ± 0.10 b	0.15 ± 0.08 b	0.17 ± 0.10 b	0.32 ± 0.41 a
Antral follicles	0.04 ± 0.08 ac	0.10 ± 0.09 a	0.03 ± 0.04 cb	0.02 ± 0.05 b	0.04 ± 0.08 bc
Atretic follicles	0.10 ± 0.05 a	0.12 ± 0.06 a	0.13 ± 0.08 a	0.09 ± 0.16 a	0.09 ± 0.14 a
Post-treatment recovery for 30 days					
Corpora lutea	0.46 ± 0.5 a	Absent	Absent	Absent	Absent
Antral follicles	0.06 ± 0.12 ac	0.02 ± 0.03 b	0.10 ± 0.22 a	0.05 ± 0.04 c	0.01 ± 0.10 b
Atretic follicles	0.09 ± 0.05 a	0.05 ± 0.11 bc	0.06 ± 0.03 b	0.08 ± 0.09 ac	0.07 ± 0.12 bc
Post-treatment recovery for 60 days					
Estrus control [†]					
Corpora lutea	0.36 ± 0.55 a	0.37 ± 0.50 a	0.50 ± 0.33 a	Absent	Absent
Antral follicles	0.08 ± 0.07 a	0.02 ± 0.02 b	0.03 ± 0.03 b	0.05 ± 0.10 b	Absent
Atretic follicles	0.15 ± 0.25 ab	0.11 ± 0.14 a	0.25 ± 0.45 b	0.25 ± 0.17 b	Absent

Values expressed as the median ± interquartile deviation. In the same line, values followed by different letters indicate statistical differences among the groups ($P < 0.05$). *Control group in the diestrus phase. [†]Control group in the estrus phase.

30-day recovery, except in the group treated with 7.5 mg/kg (Table 3). After 60-day recovery, the number and area of the atretic follicles varied among the groups in a dose-dependent manner.

Discussion

In this study, the estrous cycle and ovarian structures were affected by treatment with ND in all of the doses, and recovery periods did not restore the adverse effects, mainly when the steroid was administered at the highest dose level. The absence of changes in the ovarian weight after ND treatment probably occurred due to the presence of corpora lutea in the ovaries, even with a decrease in the population of follicles. After a 30-day recovery, the lack of corpora lutea and the marked impairment in folliculogenesis contributed to a decrease in ovarian weights. At 60 days after treatment, only the groups treated with 1.87 and 3.75 mg/kg were able to restore ovarian weight similar to the CE group, as they showed histological signs of recovery. In the groups treated with highest doses, the ovarian weight remained unchanged. It is well documented that the AAS promotes reduction in reproductive organ weights (Camargo *et al.* 2009a,b, 2014; Bento-Silva *et al.* 2010; Karbalay-Doust & Noorafshan 2012).

The suppression of estrous cyclicity caused by AAS treatment was previously reported in various studies (Gerez *et al.* 2005; Mobini Far *et al.* 2007; Bento-Silva *et al.* 2010; Camargo *et al.* 2011, 2014; Chuffa *et al.* 2011b) and severely affects the sexual cycle of women (Maravelias *et al.* 2005). According to Karbalay-Doust and Noorafshan (2012), administration of exogenous steroids may increase circulating androgen levels, thus altering the control of the hypothalamus–pituitary–gonad axis which results in altered levels of hormones, such as follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), oestrogen and progesterone (Bronson *et al.* 1996a; Bronson 1996b; Blasberg *et al.* 1997). Moreover, these hormonal disturbances may affect the regulation of the estrous cycle as observed. In this study, the persistence in diestrus in ND-treated females followed by 30 days of recovery indicates the physiological inability for resynchronization of the estrous cycle. Thus, it can be considered that these females showed a physiological anestrus. There was a pronounced effect on the estrous cycle in all of the dose levels at 60 days after recovery. The animals treated with the lower doses exhibited an irregular cycle at the end of the period, with extension of diestrus. Only females treated with the highest dose (15 mg ND/kg) had persistent diestrus after 60 days of recovery.

This study described for the first time the histopathological and morphometrical changes in the ovarian tissue arising from different doses of ND and varying according to the recovery periods. In general, both folliculogenesis and luteogenesis have been severely damaged by ND, indicating that neither doses nor period of treatment are safe when administered in therapeutic or supraphysiological levels. The lowest dose of ND (1.87 mg/kg), which is equivalent to the thera-

peutic dose used for treating anaemia (allometric scaling, Reagan-Shaw *et al.* 2007), was able to promote changes in the ovarian tissue similar to the highest doses used in the study (7.5 and 15 mg/kg). The increase in follicular atresia and the decrease in the number of corpora lutea have already been reported in females who received a single dose of ND (Gerez *et al.* 2005; Camargo *et al.* 2009a, 2011) or a combination of two synthetic steroids (Camargo *et al.* 2014). These effects may be caused indirectly via the neuroendocrine axis or even directly via androgen receptors (AR) expressed in the granulosa and theca cells (Drummond 2006). Anabolic androgenic steroids concentration induces a dose-dependent effect on the AR expression and/or oestrogen synthesis to regulate ovarian functions, so that high doses can result in advanced stage of atresia and follicular apoptosis, while lower doses stimulate folliculogenesis (Couse *et al.* 2006; Drummond 2006; Walters *et al.* 2008). Depending on AAS metabolism and oestrogen conversion rates, the inhibitory effect of androgens related to apoptotic DNA fragmentation in granulosa cells of early and pre-antral follicles is expected even at lower doses (Goyeneche *et al.* 2002).

Androgens are extensively involved in supporting luteal progesterone production following their conversion into oestrogens (Goyeneche *et al.* 2002). An explanation for this is provided by the presence of oestrogen receptors in the rat corpora lutea (CL). However, oestrogen is not always required for the action of androgens in the CL. In animals receiving doses of 1.87, 3.75 and 7.5 mg ND/kg, there was few and small CL in ovaries after treatment period. Interestingly, this effect was not observed in the group treated with 15 mg ND/kg, where number and area of CL were similar to the control group in diestrus. This normal aspect is typical of a state of persistent diestrus (Li & Davis 2007). Indeed, there is a relationship between non-aromatizable androgens and luteal progesterone secretion that is responsible for the inhibition of luteolysis (Goyeneche *et al.* 2002). In this context, high-dose ND produced persistent CL throughout the experiment, while low-dose-treated animals underwent luteolysis. Additional studies are needed to clarify the mechanism(s) of androgen-mediated formation and regression of CL.

These results suggest that the action of androstenedione on luteal progesterone production and secretion at the time of luteolysis occurs through an androgenic mechanism.

The interruption of ND treatment for 30 days was not sufficient to reverse the ovarian injuries. In addition, these ovaries showed severe histopathological alterations, characterized by marked atrophy and abundant interstitial tissue derived from changes in theca cells of the atretic follicles (Perez *et al.* 1999), decrease in the number of healthy follicles and the absence of corpora lutea. These effects were considered dose-independent, as all of the treated groups exhibited the same response. The presence of stromal fibrosis in the different groups was due to tissue degeneration. Previous studies reported that the uterus showed fibrous stroma in the rats submitted to physical effort combined with nandrolone decanoate treatment (Chuffa *et al.* 2011b)

or nandrolone decanoate alone (Gerez *et al.* 2005). Cortical fibrosis and injury to blood vessels are histopathological aspects of ovarian damage, observed in humans exposed to chemotherapy (Meirow *et al.* 2007). It is reported that pharmacological or supraphysiological doses of testosterone or AAS have resulted in vasodilatation (Sader *et al.* 2001; Littleton-Kearney & Hurn 2004). This effect has been extensively reported in animal or human coronary arteries. In female rats, it is suggested that vasodilatation is due to an increase in the aromatization of testosterone into estradiol (Shaw *et al.* 2001); however, this mechanism still needs further elucidation. According to Sader *et al.* (2001), the effects of AAS in promoting vasodilatation may be dependent on the dose, type of androgen and outcome measured. In the present study, vasodilatation observed in ovarian medulla occurred only at the dose of 7.5 mg ND/kg, in both the post-treatment and postrecovery for 30 days. Because other ND dosages promoted several histopathological changes at 30 days after treatment, we believe that this effect specifically to the animals treated with 7.5 mg ND/kg was dose dependent and 30 days of recovery was insufficient to reduce vasodilatation.

The changes in the features of ovarian tissue, associated with a decrease in the population of follicular units, are capable of promoting a further significant reproductive loss for the animal, considering that both preservation and function of the follicles are damaged. Thus, a previous study conducted in our laboratory (Belardin *et al.* 2014) showed that 60 days after last ND dose, the females were receptive to males as sperm was observed in vaginal smears, except to those females receiving the highest dose of ND (15 mg/kg). Only two females receiving 1.87 mg ND/kg became pregnant, and the rats receiving doses of 3.75 and 7.5 mg ND/kg probably did not ovulate because no uterine implantation and/or resorption site was found. Based on these results, the current study suggested that the treatment of ND is able to affect ovulation.

In ND-treated groups anomalous follicles were observed, characterized by seminiferous tubule-like structures containing Sertoli cells. These structures have been often observed in ovaries of ageing rodents (Crumeyroli-Arias *et al.* 1976). Other studies reported the presence of this type of follicle in the eutherian (Britt *et al.* 2002) or irradiated ovary (Guigon *et al.* 2005). It is known that follicular cells can survive after oocyte loss and, subsequently, transdifferentiate into immature Sertoli cells, presumably under the control of the endocrine environment and more specifically of FSH (Guigon *et al.* 2005). According to Britt *et al.* (2002) and Davis *et al.* (2000), this transdifferentiation occurs due to an alteration in the apoptotic program of granulosa cells, in which oocyte/granulosa cell interaction is disrupted and the Sertoli cells develop within atretic follicles. The involvement of oestrogen replacement in prevention of this transdifferentiation has also been reported (Britt *et al.* 2002). In this study, the absence of viable oocytes and the intense follicular atresia induced by ND contributed to the formation of seminiferous tubule-like structures, confirming the differentiation of granulosa cells into Sertoli cells. At 60 days of recovery, the

incidence of anomalous follicles was decreased in the ND-treated groups. Such structures were scarce in the most groups (varying from 1 to 2 anomalous follicles) and absent in the group treated with 3.75 mg ND/kg, suggesting that these follicles degenerated faster in this group. The mechanism which promoted the absence of anomalous follicles is unknown, but it is likely to be due to a dose-independent effect, as the range between scarce and absent anomalous follicles is too small to assign a proper dose-related response. The Sertoli cells displayed marked AR nuclear staining, similar to that observed in transdifferentiated oocyte-depleted follicles (tODFs; Guigon *et al.* 2005). This positive reaction was reduced after a longer recovery period, probably due to a downregulation of AR. In this study, the inhibin-A immunoreaction was intense in the Sertoli cells of androgenized females, agreeing with the results obtained by Guigon *et al.* (2005) in the irradiated ovaries.

Important features of the normal ovarian tissue were restored after the 60-day recovery period only in the animals treated with the lowest doses of ND (1.87 and 3.75 mg/kg). In contrast, the groups treated with the highest doses of ND, especially 15 mg/kg, still presented signals of histopathological changes.

In summary, all the different doses of ND administered (1.87–15 mg/kg) were able to cause changes to the estrous cycle and ovarian tissue of rats. Furthermore, 30 and 60 days of recovery were insufficient to completely restore the damage, mainly in animals treated with the highest dose.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding source

The authors express their gratitude to FAPESP – São Paulo Research Foundation (Processes number 2012/03813-0, 2012/01747-0 and 2013/14510-0) and FUNDUNESP – Foundation for the Development of UNESP (Process number 2178/002/14), for financial support.

References

- Arlt W. (2006) Androgen therapy in women. *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 1–11.
- Bahrke M.S. & Yesalis C.E. (2004) Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 614–620.
- Belardin L.B., Simão V.A., Leite G.A.A., Chuffa L.G.A. & Camargo I.C.C. (2014) Dose-dependent effects and reversibility of the injuries caused by nandrolone decanoate in uterine tissue and fertility of rats. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **101**, 168–177.
- Bento-Silva M.T., Martins M.C.C., Torres-Leal F.L. *et al.* (2010) Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. *Braz. J. Pharm. Sci.* **46**, 79–89.

- Bhasin S., Woodhouse L., Casaburi R. et al. (2005) Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 678–688.
- Blasberg M.E., Langan C.J. & Clark A.S. (1997) The effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle. *Physiol. Behav.* **61**, 265–272.
- Boff S.R. (2010) Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. *Rev. Bras. Cienc. Mov.* **18**, 81–88.
- Bonetti A., Tirelli F., Catapano A. et al. (2008) Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. *Int. J. Sports Med.* **29**, 679–687.
- Britt K.L., Kerr J., O'Donnell L. et al. (2002) Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *FASEB J.* **16**, 1389–1397.
- Bronson F.H. (1996b) Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **53**, 329–334.
- Bronson F.H., Nguyen K.Q. & De La Rosa J. (1996a) Effect of anabolic steroids on behavior and physiological characteristics of female mice. *Physiol. Behav.* **59**, 49–55.
- Camargo I.C.C., Souza R.B., Mesquita S.F.P., Chuffa L.G.A. & Frei F. (2009a) Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical effort. *Acta Biol. Hung.* **60**, 253–261.
- Camargo I.C.C., Gaspar A.L.C., Frei F. & Mesquita S.F.P. (2009b) Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* **31**, 453–460.
- Camargo I.C.C., Gênova T.C., Machado M.C.P., Frei F. & Mesquita S.F.P. (2011) Administração experimental de esteróide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfológicas nos ovários e útero de ratas adultas. *Biosci. J.* **27**, 656–665.
- Camargo I.C.C., Leite G.A.A., Pinto T. & Ribeiro-Paes J.T. (2014) Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 195–202.
- Cannavò S., Curtò L. & Trimarchi F. (2001) Exercise-related female reproductive dysfunction. *J. Endocrinol. Invest.* **24**, 823–832.
- Chuffa L.G., Amorim J.P., Teixeira G.R. et al. (2011a) Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**, 217–223.
- Chuffa L.G.A., Souza R.B., Frei F., Mesquita S.F.P. & Camargo I.C.C. (2011b) Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anat. Rec.* **294**, 335–342.
- Chuffa L.G., Seiva F.R., Fávaro W.J. et al. (2013) Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reprod. Toxicol.* **39**, 40–49.
- Clark A.S. & Fast A.S. (1996) Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav. Neurosci.* **110**, 1478–1486.
- Couse J.F., Hewitt S.C., Korach K.S. (2006) Chapter 15, Steroid Receptors in the Ovary and Uterus. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edition, (eds J.D. Neill), Academic Press, New York, 593–608.
- Crumeyrolle-Arias M., Scheib D. & Aschheim P. (1976) Light and electron microscopy of the ovarian interstitial tissue in the senile rat: normal aspect and response to HCG of “deficiency cell” and “epithelial cords”. *Gerontology* **22**, 185–204.
- Cunha T.S., Cunha N.S., Moura M.J.C.S. & Marcondes F.K. (2004) Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Braz. J. Pharm. Sci.* **40**, 165–179.
- Davis B.J., McCurdy A.E., Miller B.D., Lucier G.W. & Tritscher A.M. (2000) Ovarian tumors in rats induced by chronic 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin treatment. *Cancer Res.* **60**, 5414–5419.
- Drummond A.E. (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**, 450.
- Evans N.A. (1997) Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. *Br. J. Sports Med.* **31**, 54–58.
- Evans N.A. (2004) Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am. J. Sports Med.* **32**, 534–542.
- Fermo R.S., Rego J.N.I., Fraquini J.V.M. & Andrade T.U. (2008) Efeito da suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em ratos. *Rev. Eletr. Farm.* **5**, 111–121.
- Gerez J.R., Frei F. & Camargo I.C.C. (2005) Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception* **72**, 77–80.
- Goldman J.M., Murr A.S. & Cooper R.L. (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **80**, 84–97.
- Goyeneche A.A., Calvo V., Gibori G. & Telleria C.M. (2002) Androstenedione interferes in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production. *Biol. Reprod.* **66**, 1540–1547.
- Guigon C.J., Coudouel N., Mazaud-Guittot S., Forest M.G. & Margre S. (2005) Follicular cells acquire Sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* **146**, 2992–3004.
- Hoffman J.R. & Ratamess N.A. (2006) Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? *J. Sports Sci. Med.* **5**, 182–193.
- Iriart J.A.B., Chaves J.C. & De Orleans R.G. (2009) Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cad. Saúde Pública.* **25**, 773–782.
- Kam P.C.A. & Yarrow M. (2005) Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia* **60**, 685–692.
- Karbalay-Doust S. & Noorafshan A. (2006) Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. *Micron* **37**, 617–623.
- Karbalay-Doust S. & Noorafshan A. (2012) Stereological estimation of ovarian oocyte volume, surface area and number: application on mice treated with nandrolone decanoate. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 275–279.
- Kicman A.T. (2008) Pharmacology of anabolic steroids. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 502–521.
- Li S. & Davis B. (2007) Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* **80**, 246–252.
- Lise M.L.Z., Gama e Silva T.S., Ferigolo M., Barros H.M.T. (1999) O abuso de esteroides anabólicos androgênicos em atletismo. *Rev. Ass. Med. Bras.* **45**, 364–370.
- Littleton-Kearney M. & Hurn P.D. (2004) Testosterone as modulator of vascular behavior. *Biol. Res. Nurs.* **5**, 276–285.
- Maravelias C., Dona A., Stefanidou M. & Spiliopoulou C. (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes – A constant threat. *Toxicol. Lett.* **158**, 167–175.

- Marcondes F.K., Bianchi F.J. & Tanno A.P. (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* **62**, 609–614.
- Marqueti R.C., Prestes J., Wang C.C. *et al.* (2010) Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **21**, e91–e99.
- Meirow D., Dor J., Kaufman B. *et al.* (2007) Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum. Reprod.* **22**, 1626–1633.
- Mobini Far H.R., Agren G., Lindqvist A.S., Marmendal M., Fahlke C. & Thiblin I. (2007) Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **131**, 189–197.
- Paccola C.C., Resende C.G., Stumpp T., Miraglia S.M. & Cipriano I. (2013) The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod.* **10**, 677–683.
- Pedersen T., Peters H. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.*, **17**, 208–212.
- Perez J.F., Conley A.J., Dieter J.A., Sanz-Ortega J. & Lasley B.L. (1999) Studies on the origin of ovarian interstitial tissue and the incidence of endometrial hyperplasia in domestic and feral cats. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**, 10–20.
- Perry P.J., Lund B.C., Deninger M.J., Kutscher E.C. & Schneider J. (2005) Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey and drug utilization. *Clin. J. Sport Med.* **15**, 326–330.
- Plowchalck D.R., Smith B.J. & Mattison C.R. (1993) Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantification and morphometrics. *Methods Toxicol.* **3**, 57–68.
- Reagan-Shaw S., Nihal M. & Ahmad N. (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**, 659–661.
- Sader M.A., Griffiths K.A., McCredie R.J., Handelsman D.J. & Celermajer D.S. (2001) Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 224–230.
- Shaw L., Taggart M. & Austin C. (2001) Effects of the oestrus cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 β -oestradiol. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 1055–1062.
- Silva P.R.P., Danielski R. & Czepielewski M.A. (2002) Esteroides anabolizantes no esporte. *Rev. Bras. Med. Esporte.* **8**, 235–243.
- Thiblin I. & Petersson A. (2004) Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: a review. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **19**, 27–44.
- Walters K.A., Allan C.M. & Handelsman D.J. (2008) Androgen actions and the ovary. *Biol. Reprod.* **78**, 380–389.
- Westwood F.R. (2008) The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.* **36**, 375–384.

CAPÍTULO III

Efeitos do decanoato de nandrolona na regulação ovariana de ratas após os períodos de tratamento e de recuperação

Vinícius Augusto Simão, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa e Isabel Cristina Cherici
Camargo

Manuscrito elaborado para submissão ao periódico *Reproduction* ISSN 1470-1626 (print); 1741-7899 (online). Publicado mensalmente. Fator de impacto: 3.174.

Efeitos do decanoato de nandrolona na regulação ovariana de ratas após os períodos de tratamento e de recuperação

Vinícius Augusto Simão¹, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa² & Isabel Cristina Cherici Camargo^{1*}

¹*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas. Assis, SP, Brasil.*

²*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Anatomia. Botucatu, SP, Brasil.*

Título curto: Regulação da função ovariana e esteroide sintético

*Endereço para correspondência: Isabel Cristina Cherici Camargo, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas. 19806-900, Assis, SP, Brasil.

Tel.: +55 18-3302 5852; Fax: +55 18-3302 5849.

E-mail: camargo@assis.unesp.br

RESUMO

Apesar do conhecimento sobre os efeitos de esteroides anabólicos androgênicos na reprodução terem avançado na última década, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na promoção e reversibilidade dos efeitos colaterais. Neste estudo, avaliou-se os efeitos de diferentes doses de decanoato de nandrolona (DN) no ciclo estral e histologia ovariana de ratas, com ênfase no controle da imunexpressão do AR, ERs e CYP450 aromatase e dos níveis hormonais sexuais após os períodos de tratamento e de recuperação. Ratas Wistar foram tratadas com DN nas doses de 1,87, 3,75, 7,5 e 15 mg/kg de peso corporal ou óleo mineral (grupo Controle) durante 15 dias, via subcutânea e divididas nos períodos: (a) tratamento com DN por 15 dias; (b) tratamento com DN e recuperação de 30 dias; (c) tratamento com DN e recuperação de 60 dias. O ciclo estral foi monitorizado e no final de cada período, os animais foram sacrificados para coleta do soro sanguíneo e análise histopatológica através da imunolocalização e quantificação dos receptores ovarianos. Após os períodos de tratamento com DN e recuperação por 30 dias, os animais exibiram diestro persistente, mantido apenas no grupo de 15 mg DN/kg após recuperação de 60 dias. O peso ovariano diminuiu em todos os períodos do estudo. Marcantes alterações histopatológicas ocorreram de forma período-dependente e estiveram relacionados aos níveis dos hormônios sexuais e de expressão dos receptores ovarianos alterados de maneira dose-específica. Os 60 dias de repouso foram suficientes para recuperação dos efeitos colaterais apenas nos grupos de 1,87 e 3,75 mg DN/kg. Concluiu-se que o período de recuperação de 60 dias foi eficiente em restabelecer a função ovariana nas menores doses do esteroide e que os níveis hormonais e de expressão dos receptores ovarianos podem se recuperar após marcante desregulação promovida pelo tratamento androgênico.

INTRODUÇÃO

Esteroides anabólicos androgênicos são derivados sintéticos do hormônio testosterona e foram desenvolvidos com finalidades terapêuticas para o tratamento de diversas doenças (Cunha et al., 2004). Dentre os EAA, o decanoato de nandrolona é a forma injetável mais utilizada (Boff, 2010). Apesar de a prescrição e a comercialização destes medicamentos serem controladas em diversos países, tais drogas são utilizadas indiscriminadamente por atletas ou não para aumentar a massa muscular e a resistência em um curto espaço de tempo (Iriart et al., 2009). Geralmente essas substâncias são administradas em doses supra fisiológicas, podendo alcançar até 100 vezes a recomendação terapêutica para várias doenças (Clark & Fast, 1996).

Ao longo da última década, o uso abusivo de EAA por mulheres aumentou significativamente (Thiblin & Petersson, 2004), e inevitavelmente são desencadeados os efeitos androgênicos, os quais são responsáveis pelos efeitos colaterais indesejáveis (Kicman, 2008). Os estudos sobre os efeitos que os EAA causam na reprodução feminina ainda são escassos, mas avançaram muito na última década e relataram que o esteroide sintético decanoato de nandrolona é capaz de causar alterações no ciclo estral (Gerez et al., 2005, Camargo et al., 2009a; Chuffa et al., 2011; Camargo et al., 2014), suprimir a capacidade reprodutiva das fêmeas (Camargo et al., 2009b; Camargo et al., 2014; Belardin et al., 2014) e causar alterações histopatológicas nos ovários e útero (Gerez et al., 2005; Camargo et al., 2009a; Chuffa et al., 2011; Camargo et al., 2014) de maneira dose e período-dependente (Belardin et al., 2014; Simão et al., 2015).

Tanto os EAA quanto seus metabólitos exercem suas funções quando ligados aos receptores de andrógeno (AR). No entanto, os EAA, incluindo a nandrolona, podem ser aromatizados em estrogênios por um processo mediado pela enzima citocromo P450 aromatase. Os estrogênios por sua vez, exercem suas atividades através dos receptores de estrógeno - ERs (conhecidos pelas isoformas ER- α e ER- β) (Clark et al., 2006; Drummond & Fuller, 2012).

Ambas as sinalizações mediadas por AR e ER são extremamente importantes para direcionar a ação dos esteroides no tecido reprodutivo, e qualquer alteração na regulação hormônio-receptor pode comprometer a função destes tecidos.

A foliculogênese é bastante complexa, e nela estão envolvidos diversos fatores de crescimento e hormônios, como as gonadotrofinas FSH e LH, os esteroides estradiol (E2) e progesterona (P4) e andrógenos como a testosterona (T) e a diidrotestosterona (DHT) (Lima-Verde et al., 2011). Os andrógenos em excesso estão associados a patologias no trato reprodutor feminino, tais como a síndrome dos ovários policísticos (SOP) (Ehramnn, 2005). Nesta condição, os ovários exibem aumento no número de cistos foliculares e corpos lúteos ocasionais. A morfologia ovariana de ratas tratadas com esteroides sintéticos apresenta aspecto similar ao da SOP (Camargo et al., 2014; Simão et al., 2015). Os andrógenos exógenos exercem efeitos inibidores ou estimulantes nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular (Wang & Chang, 2004; Walters et al., 2008). No entanto, não é bem conhecido se os efeitos se devem somente ao mediador AR ou também à conversão do andrógeno a outros esteroides, com potencial de exercer ações indiretas, como por exemplo, a via ER.

Apesar dos recentes avanços, ainda não há estudos que relacionem os efeitos dos EAA em função da dose e diferentes períodos de avaliação sobre a interação hormônio-receptor nos tecidos reprodutivos femininos. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes doses de decanoato de nandrolona sob a regulação hormonal e a imunexpressão dos receptores esteroidais ovarianos, após os períodos de tratamento e de recuperação por 30 e 60 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratas Wistar adultas (*Rattus norvegicus albinus*), com 12 semanas de idade e peso de aproximadamente 250g, foram obtidas da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Botucatu,

SP, Brasil) e mantidas no Biotério Central da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP - Assis, SP, Brasil). As fêmeas foram alojadas em caixas de polipropileno (43cm x 30cm x 15cm, 3 animais por caixa) forradas com aparas de pinheiro e mantidas em condições adequadas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (12L, 12D fotoperíodo, 200 lux). Foram oferecidas água e dieta comercial (Nuvilab[®], Colombo, PR, Brasil) *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Número de permissão: 005/2011; 31 de agosto).

Fármaco

Foi utilizado o esteroide anabólico androgênico (EAA), decanoato de nandrolona (17 β -hidroxi-19-nor-4-androsteno-3-ona) adquirido do Laboratório Schering-Plough (São Paulo, Brasil), sob o nome de Deca Durabolin[®]. Este é uma solução injetável, contendo 50 mg do andrógeno, disponível como solução oleosa (Marqueti et al., 2010).

Procedimento experimental

As fêmeas obtidas com ciclo estral regular foram pesadas e divididas aleatoriamente em cinco grupos (n = 18/grupo): (C) Controle, tratado com injeção de 0,1 ml de óleo mineral durante 15 dias consecutivos por via subcutânea (s.c.); e (DN) tratados com quatro diferentes doses de decanoato de nandrolona (1,87; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg de peso corpóreo), por meio de uma única injeção diária da droga diluída em veículo, via s.c., durante 15 dias consecutivos. As injeções foram administradas no mesmo intervalo de tempo (12h30min-13h00min), para minimizar as alterações no ciclo estral.

Cada grupo experimental foi dividido de acordo com os três períodos do estudo (n = 6 ratas/grupo por período, Fig. 1A-C.): animais tratados com DN durante 15 dias consecutivos e eutanasiados ao final do período de tratamento (A), e tratamento com DN durante 15 dias,

seguido por um período de recuperação de 30 (B) ou 60 dias (C) e eutanasiados ao final destes períodos. Devido ao prolongamento da fase de diestro nas ratas DN durante os períodos do estudo, a eutanásia foi realizada em todas as fêmeas nesta fase do ciclo, ao final de cada período, inclusive nas do grupo controle para fins de comparação com as ratas androgenizadas. Após cada período (15 dias de tratamento, 30 e 60 dias de recuperação), as fêmeas foram pesadas e sacrificadas por saturação anestésica em CO₂ seguido por decapitação para coleta de sangue. Os ovários foram coletados e pesados, e os pesos relativos foram obtidos (peso do órgão/peso corporal X 100, expresso como g/100 g de peso corporal).

Seleção das dosagens

As doses de 7,5 e 15 mg de DN/kg foram selecionadas com base em estudos anteriores em animais (Blasberg et al., 1997; Camargo et al., 2011; Mobini Far et al., 2007) e simulam as condições geralmente empregadas por usuários não terapêuticos de EAA (variando de 200 a 3200 mg/semana; Evans, 1997). As doses de 1,87 e 3,75 mg DN/kg foram utilizadas para avaliar os efeitos de doses recomendadas para diversos tratamentos (variando de 50 a 200 mg/semana; Evans, 1997) ou doses mais baixas do que doses de substituição fisiológica (variando de 25 a 600 mg/semana; Bhasin et al., 2005).

Avaliação do ciclo estral

Durante os períodos de tratamento e de recuperação, o ciclo estral foi monitorado diariamente por exame citológico (secreção vaginal, Marcondes et al., 2002). O horário de coleta foi fixado às 09h00min. As lâminas contendo as células do epitélio vaginal foram analisadas sob um microscópio de luz (Olympus CX31 RBSFA, Tóquio, Japão). As fases do ciclo estral foram identificadas segundo o critério descrito por Goldman et al. (2007).

Imunohistoquímica

Os ovários direito foram fixados em formalina tamponada a 10% (0,2 M NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 0,2 M, 37% de formaldeído LABIMPEX Ltda., Diadema, SP, Brasil, pH 7,2) por 24 h. Em seguida, o tecido foi desidratado em soluções de etanol e clarificadas em xilol para inclusão em parafina (Paraplast Labware-Oxford, St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram cortados em secções de 4µm de espessura em um micrótomo RM2125 LEICA (Alemanha) e as secções de tecido foram ao micro-ondas (700-800W), enquanto imerso em tampão de citrato de sódio 0,01 M, pH 6,0 para a recuperação de antígeno. Depois de bloquear a atividade da peroxidase endógena, o tecido foi incubado com 3% de albumina de soro bovino (BSA, 3%) durante 1 h para evitar a ligação não específica. Subsequentemente, as secções de ovário foram incubadas numa câmara úmida durante a noite à 4°C com o anticorpo primário do receptor de andrógeno (AR) (diluição 1: 100, NB300-551, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), anti-receptor de estrogênio alfa (ER-α) (diluição 1: 100, NB110-56961, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), anti-receptor de estrogênio beta (ER-β) (1 ug de diluição/ml, NB120-3577, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) e anti-cytP450 aromatase (diluição 1: 100, NBP1-19697, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA). Depois das reações imunológicas, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, cloreto de sódio, cloreto de potássio, di-hidrogênio fosfato, e fosfato de hidrogênio dissódico) e incubado com o anticorpo secundário (Polímero Anti-Mouse IgG ou anti-Rabbit - DAKO[®] CYT) em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, as lâminas foram colocadas para reagir com o cromógeno diaminobenzidina (DAB; Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 5 minutos e posteriormente as secções foram contrastadas com hematoxilina. Os controles negativos foram realizados omitindo o anticorpo primário.

Os resultados foram analisados sob um microscópio Zeiss Âmbito A1-axio (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com base nos seguintes níveis de intensidade de coloração: ausente, fraca,

moderada e forte reação. As imagens digitais foram capturadas com um fotomicroscópio (Âmbito A1-Axio acoplado a uma vídeo-câmera AxioCam ICc3) e digitalizadas pelo software Axio Vision, versão 4.7.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Imunoblots e quantificação proteica

Após cada período experimental (tratamento e recuperação), os ovários esquerdos foram removidos e congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . Os tecidos foram homogeneizados utilizando o tampão de lise RIPA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) (0,5 M de Tris-HCl, NaCl 1,5 M, ácido 2,5% desoxicólico, 10% de NP-40, EDTA 10 mM, pH 7,4) e o coquetel inibidor de protease (Sigma Chemical Co.), utilizando um homogeneizador (Ultra IKA® T10 básico, Staufen, Alemanha). Alíquotas contendo 1: 10 (v/v) de diluições em Triton X-100 foram adicionados ao homogeneizado, e as amostras foram colocadas em gelo seco com agitação durante 2 h para melhorar a extração. Estas suspensões foram centrifugadas a $21.912 \times g$ durante 20 min a 4°C e o sedimento descartado. A proteína total foi medida através da determinação colorimétrica. Todas as proteínas foram dissolvidas em tampão de amostra de $1,5\times$ e usadas para a extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Quantidades iguais de proteína (70 ug) por poço foram colocadas em géis pré-formados de gradiente 4-12% de acrilamida (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), com um sistema de eletroforese em tampão de corrida Tris-glicina (60 mA fixo durante 2 h). Após a eletroforese, as proteínas totais foram eletro-transferidas (200 mA durante 1,5 h fixo) para membranas de nitrocelulose de $0,2 \mu\text{m}$ em tampão Tris-glicina-metanol. O padrão pré-corado Caleidoscópio (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado como marcador de peso molecular. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com uma solução de TBS-T contendo BSA a 3% à temperatura ambiente (TA) durante 60 min e, em seguida, incubou-se a 4°C durante a noite com o anticorpo primário policlonal anti-rabbit AR (NB300-551, Novus

Biologicals, Littleton, CO, EUA); anti-rabbit receptor monoclonal de ER- α (NB110-56961, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), anti-receptor de ER- β (NB120-3577) e anti-cytP450 aromatase policlonal de coelho (NBP1-19697, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA). Todas as diluições de 1:500, 1:5000, 1 μ g/mL e 1:1000 foram realizadas a 1% de BSA, respectivamente. Isto foi seguido por 3×5 min de lavagem em solução salina de tampão Tris e Tween 20 (TBS-T), em seguida incubou-se durante 2 h à TA com anticorpos secundários anti-rabbit conjugados com HRP (diluído a 1: 1000 em BSA a 1%; Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, EUA). Depois de se lavar sequencialmente com TBS-T, os sinais foram reforçados e a atividade da peroxidase foi finalmente detectada por mistura de 10 mL de PBS, 8 μ L de H₂O₂ e 0,02 g de DAB (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, EUA). Depois da lavagem sequencial com TBS-T, as localizações das bandas foram detectadas utilizando-se um kit de substrato de quimiluminescência (ECL Western Blotting Pierce Substrato - GE Healthcare[®], Pittsburgh, PA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os substratos foram removidos a partir das membranas e os sinais de ECL foram capturados pela câmara CCD (G:BOX Chemi, Syngen[®], Sacramento, CA, USA). A densidade óptica integrada (IOD) das bandas de proteínas alvo foi medida usando o software Image J. (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, Maryland, EUA) para comparar os níveis de proteína. β -actina foi utilizado como um controle endógeno positivo e os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (SEM). Concentrações do imunoblot (%) foram representadas como valores de densitometria óptica (banda de intensidade-pixels/razão da β -actina).

Ensaio de hormônios sexuais

Amostras de sangue foram coletadas (08h00min-10h30min) em tubos Falcon a partir do tronco cerebral de ratas decapitadas de cada grupo experimental (n = 18/grupo). O soro foi obtido por centrifugação a $1200 \times g$ durante 15 min à 4°C e armazenadas à -20°C até serem

ensaiadas. Os níveis séricos de FSH (KT-15332, Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, EUA), LH (026.576, Bioassay, Swampscott, MA, EUA), Estradiol (E2) (582.251), Progesterona (P4) (582.601), Testosterona (T) (582.701) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) e DHT (KA1886, Abnova, Walnut, CA, EUA) foram medidos por imunoenensaio ligado à enzima específica (ELISA) e a leitura foi realizada no Epoch espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis séricos foram expressos como nanogramas/mililitro (ng/mL).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio da análise paramétrica de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, de acordo com as características de cada variável. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (SEM) ou mediana \pm desvio interquartilico. A significância estatística foi dada para $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

Tratamento androgênico afeta o ciclo estral das ratas de maneira dose e período-dependente

Todas as ratas experimentais tiveram o ciclo estral afetado pelo DN. Durante o período de tratamento, nos diferentes níveis de doses de DN, as ratas manifestaram um aumento ($p < 0,05$) no número de dias em diestro (Fig. 2A), em comparação ao grupo controle. A influência do tratamento androgênico manteve os grupos em diestro durante todo o período de recuperação de 30 dias (Fig. 2B). Durante os 60 dias de recuperação, verificou-se que as fêmeas tratadas com as doses mais baixas (1,87 e 3,75 mg DN/kg) restauraram o ciclo no 48º e 55º dias, respectivamente, e o número de dias em diestro no período foi de 51 e 57, respectivamente (Fig.

2C). O grupo tratado com 7,5 mg DN/kg exibiu diestro até o 59º dia, e na dose de 15 mg DN/kg as ratas mantiveram-se em diestro durante os 60 dias de recuperação (Fig. 2C).

Peso ovariano

O peso relativo dos ovários foi reduzido ($p < 0,05$) nos grupos esteroidais após o período de tratamento, comparativamente ao grupo controle (Fig. 3). Os grupos DN não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Após o período de recuperação de 30 dias, a redução no peso gonadal foi mais acentuada ($p < 0,05$) em todos os grupos DN, em comparação ao grupo controle (Fig. 3), e o grupo tratado com 7,5 mg DN/kg apresentou maior ($p < 0,05$) peso ovariano que os grupos de menores doses, mas foi similar ($p > 0,05$) ao grupo de 15 mg DN/kg. Aos 60 dias de recuperação, apenas o grupo de 1,87 mg DN/kg restabeleceu o peso ovariano a valores semelhantes ($p > 0,05$) ao do grupo controle. Os demais grupos esteroidais mantiveram o peso ovariano reduzido ($p < 0,05$), em comparação aos grupos controle e tratado com a menor dose de DN (Fig. 3).

Níveis de AR, ER- α , ER- β e CYP450 aromatase são diferentemente influenciados pelas doses de decanoato de nandrolona no tecido ovariano

AR

A expressão do AR variou em função da dose esteroidal empregada. Após o período de tratamento a dose de 15 mg DN/kg diferiu ($p < 0,05$) na expressão do receptor na comparação com os demais grupos experimentais. Também houve maior ($p < 0,05$) expressão do receptor nos grupos de 3,75 e 7,5 mg DN/kg na comparação com o controle e a menor dose esteroidal que foram similares ($p > 0,05$) entre si (Fig. 4B). A imuno-histoquímica mostrou que nos grupos esteroidais o nível de marcação para o AR foi moderado ou forte na camada granulosa dos folículos atresícos predominantes nos ovários, nos pequenos e escassos corpos lúteos e nas

células intersticiais (Fig. 4C, E e F). No grupo controle a marcação foi moderada nas estruturas atrésicas (Fig. 4D). Após os 30 dias de recuperação, os níveis do receptor estiveram elevados ($p < 0,05$) em todos os grupos esteroidais na comparação com o controle (Fig. 4B). Na imunohistoquímica houve uma marcante diminuição na marcação do AR nos folículos primordiais e atrésicos (Fig. 4G-J). Estruturas como epitélio germinativo, folículos em crescimento e antrais, mantiveram a alta expressão do AR, principalmente na maior dose esteroidal (15 mg DN/kg). Com exceção do grupo tratado com 7,5 mg DN/kg a expressão do AR manteve-se elevada ($p < 0,05$) nas ratas androgenizadas (Fig. 4B) na comparação com o controle após o período de recuperação de 60 dias. Sendo que o grupo de 15 mg DN/kg apresentou níveis superiores ($p < 0,05$) aos grupos de menor dose esteroidal. Houve alta imunomarcação para o AR nos ovócitos, no corpo lúteo (Fig. 4K-M), no tecido intersticial (Fig. 4N) e nos diversos tipos foliculares (primordiais, crescimento, antrais e atrésicos) dos grupos esteroidais, com menor intensidade apresentada pelo grupo de 7,5 mg DN/kg. Além disso, os grupos controle, 1,87 e 3,75 mg DN/kg apresentaram efeito período-dependente na expressão do AR (Fig. 4B). No grupo esteroidal de 3,75 mg DN/kg a expressão do receptor foi maior ($p < 0,05$) após o período de recuperação de 30 dias na comparação com o período de tratamento. O mesmo ocorreu com o grupo controle apenas no período de recuperação de 60 dias. No grupo de 1,87 mg DN/kg os níveis de expressão do AR após o período-tratamento foi estatisticamente inferior a ambos os períodos de recuperação.

ER- α

Os grupos que receberam 1,87 e 3,75 mg DN/kg apresentaram menor ($p < 0,05$) expressão do ER- α na comparação com os demais grupos experimentais do período pós-tratamento (Fig. 5B). A imunolocalização do ER- α mostrou que estruturas ovarianas, tais como, folículos atrésicos, corpos lúteos e tecido intersticial (Fig. 5D-F), apresentaram uma maior intensidade de

expressão do receptor no grupo tratado com o nível mais alto do esteroide (Fig. 5F). O ER- α apresentou moderada intensidade de coloração nos folículos primários, em crescimento e antrais (Fig. 5C) em todos os grupos experimentais. Após o período de recuperação de 30 dias, a expressão do ER- α foi elevada ($p < 0,05$) apenas na maior dose (Fig. 5B). A camada granulosa dos folículos atresicos e o tecido intersticial (Fig. 5H-J), diminuíram a imunomarcção para o receptor nos grupos tratados com 1,87, 3,75 e 7,5 mg DN/kg. Nos demais componentes do tecido ovariano, a expressão do ER- α foi inalterada independente do grupo experimental. Após o período de recuperação de 60 dias, a dose de 15 mg DN/kg sofreu uma significativa queda nos níveis de expressão do ER- α na comparação com os demais grupos esteroidais, sendo que o grupo de 1,87 mg DN/kg foi superior ($p < 0,05$) também ao controle (Fig. 5B). Na imunorreção para o receptor no tecido ovariano houve marcante redução na expressão do ER- α no grupo da maior dose esteroideal (Fig. 5K), enquanto nas doses de 1,87 e 3,75 mg DN/kg, a reação aumentou principalmente nos folículos atresicos (Fig. 5M e N), corpos lúteos e tecido intersticial de forma similar ao controle (Fig. 5L) e discretamente mais intensa à dose de 7,5 mg DN/kg.

A expressão do ER- α foi período-dependente para todas as doses do tratamento com DN (Fig. 5B). Assim, comparando-se o grupo de 1,87 mg DN/kg entre cada período do estudo, observa-se o aumento ($p < 0,05$) na expressão do receptor conforme o período de recuperação. Na dose de 3,75 mg DN/kg a expressão do ER- α após o repouso de 60 dias foi superior ($p < 0,05$) aos demais períodos experimentais. Ainda neste período, a quantificação para o grupo de 7,5 mg DN/kg foi superior ($p < 0,05$) apenas na comparação com o período de recuperação de 30 dias, no qual a expressão do ER- α para o grupo de 15 mg DN/kg diferiu dos demais períodos avaliados.

ER- β

Na quantificação do ER- β (Fig. 6A) todos os grupos apresentaram valores inferiores ($p < 0,05$) ao do grupo esteroideal de 15 mg DN/kg após o período de tratamento (Fig. 6B). Na

imunohistoquímica, a expressão do ER- β foi predominante nos folículos saudáveis e atresicos (teca e granulosa) (Fig. 6C, E e F), com maior marcação no citoplasma que no núcleo celular, enquanto no controle a expressão variou de baixa a moderada (Fig. 6D). Após o período de recuperação de 30 dias, a expressão do ER- β foi similar ($p>0,05$) entre os grupos esteroidais, no entanto, quando comparado ao controle, apenas as doses de 7,5 e 15 mg DN/kg foram superiores ($p<0,05$) (Fig. 6B). A imunorreação para o receptor mostrou que os ovócitos, tecido intersticial e o núcleo das células granulosas dos folículos antrais (Fig. 6G, I e J) e atresicos apresentaram alta marcação do receptor nos grupos androgenizados. O grupo controle manteve a expressão folicular de intensidade moderada (Fig. 4H). Não houve diferença ($p>0,05$) na expressão do ER- β entre os grupos experimentais no período mais longo de recuperação, a exceção foi o grupo de 15 mg DN/kg que manteve-se superior ($p<0,05$) ao controle (Fig. 6B). Na imuno-histoquímica houve a intensificação da marcação nos folículos antrais, em função do aumento na dose do esteroide (Fig. 6K, M e N). Na comparação de cada grupo experimental entre os períodos (Fig. 6B), houve resultado período-dependente na expressão do ER- β no grupo de 3,75 mg DN/kg no período pós-tratamento na comparação com os demais períodos do estudo ($p<0,05$), e nos grupos de 1,87 e 7,5 mg DN/kg após os 30 dias de repouso na comparação com o pós-tratamento ($p<0,05$).

CYP450

Os níveis de CYP450 aromatase também foram alterados em função do DN, de forma que após o período de tratamento houve maior ($p<0,05$) expressão do receptor em todos os grupos esteroidais comparativamente ao controle (Fig. 7B). Entre os grupos esteroidais não houve alteração significativa. A expressão do receptor CYP450 variou entre baixa a moderada intensidade em diversas estruturas ovarianas (Fig. 7C) e houve um aumento na expressão das células luteínicas no grupo de maior dose (15 mg DN/kg; Fig. 7F), em comparação aos grupos controle (Fig. 7D) e tratados com as demais doses de DN (Fig. 7C e E). A expressão do CYP450

(Fig. 7A) foi reduzida no grupo tratado com 7,5 mg DN/kg em comparação aos demais grupos experimentais após o período de recuperação de 30 dias (Fig. 7B), além disso, o grupo de 15 mg DN/kg diferiu dos grupos esteroidais de menor dose. Fraca imunomarcagem do receptor foi observada no tecido intersticial e nos folículos em crescimento, antrais e atresicos dos grupos DN (Fig. 7C, E e F) e controle (Fig. 7D). Após o período de recuperação de 60 dias a análise do receptor CYP450 aromatase (Fig. 7A), mostrou que todos os grupos experimentais apresentaram resultados similares ($p>0,05$) (Fig. 7B). A análise imuno-histoquímica obteve fraca intensidade de coloração na camada granulosa dos folículos antrais dos grupos esteroidais (Fig. 7K e M), semelhante ao grupo controle (Fig. 7L), com exceção do grupo de 15 mg DN/kg que apresentou intensidade moderada (Fig. 7U). Na comparação dos períodos de recuperação com o período pós-tratamento, houve redução ($p<0,05$) na expressão da aromatase nos grupos esteroidais após a interrupção do tratamento androgênico.

Dosagem hormonal

Após os períodos de tratamento e de recuperação de 30 dias, todos os grupos experimentais apresentaram níveis de FSH similares ($p>0,05$). Já no período de recuperação de 60 dias, apenas o grupo tratado com 7,5 mg DN/kg sofreu redução ($p<0,05$) nos níveis de FSH (Fig. 8A).

Houve variações nos níveis de LH em função da dose de esteroide. Após o período de tratamento, os grupos de 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg apresentaram níveis hormonais mais elevados ($p<0,05$). Aos 30 dias de recuperação, houve um aumento significativo no nível de LH no grupo de 7,5 mg DN/kg, em comparação com a menor dose. Os grupos que receberam 7,5 e 15 mg DN/kg apresentaram níveis mais elevados de LH após o período mais longo de recuperação, mas apenas o grupo de maior dose de DN diferiu significativamente do grupo controle (Fig. 8B).

Os níveis de P4 foram reduzidos ($p < 0,05$) nos grupos DN após o período de tratamento, em comparação ao grupo controle. Além disso, nas doses de 1,87 e 15 mg DN/kg, os níveis de P4 foram significativamente menores que as doses intermediárias (3,75 e 7,5 mg DN/kg). Após o período de recuperação de 30 dias, os grupos DN mantiveram o P4 reduzido ($p < 0,05$). Os grupos DN apresentaram níveis hormonais similares durante o período. Os grupos tratados com as duas menores doses de DN recuperaram os níveis de P4 a uma quantidade similar ($p > 0,05$) ao grupo controle após o período de recuperação de 60 dias. Nas doses de 7,5 e 15 mg DN/kg os níveis de P4 mantiveram-se reduzidos ($p < 0,05$) (Fig. 8C).

Os níveis de E2 foram mais elevados ($p < 0,05$) nas doses de 7,5 e 15 mg DN/kg após o período de tratamento. Após o período de recuperação de 30 e 60 dias, houve uma marcante diminuição nos níveis de E2 nos grupos esteroidais, mas sem diferença significativa entre os grupos (Fig. 9A).

Após o período de tratamento, os níveis de T (Fig. 9B) aumentaram ($p < 0,05$) nos grupos que receberam as doses de 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg. Aos 30 dias de recuperação, os níveis do andrógeno diminuíram nos grupos DN, quando comparados ao período pós-tratamento, no entanto, o nível de T manteve-se elevado ($p < 0,05$) na dose mais alta de DN. Houve marcante queda nos níveis de T nos grupos DN após o período de recuperação de 60 dias, ainda assim, o grupo de 15 mg DN/kg esteve elevado ($p < 0,05$) (Fig. 9B).

Os níveis de DHT foram maiores ($p < 0,05$) nos grupos que receberam o DN após o período de tratamento. No período pós-recuperação de 30 dias, os grupos tratados com as doses de 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg mantiveram os níveis de DHT elevados ($p < 0,05$). No período, também houve diferença ($p < 0,05$) nos níveis hormonais entre o grupo de 1,87 mg DN/kg e aqueles que receberam as duas maiores doses. Após o período de recuperação de 60 dias, apenas o grupo tratado com a dose de 15 mg DN/kg apresentou níveis de DHT superiores ($p < 0,05$) (Fig. 9C).

DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas a imunolocalização e quantificação dos receptores esteroidais AR, ER- α , ER- β e CYP450 aromatase no tecido ovariano, assim como, os níveis hormonais em ratas submetidas a diferentes doses de decanoato de nandrolona e períodos de tratamento e recuperação.

A ciclicidade estral das ratas foi influenciada negativamente pelo tratamento esteroidal, em concordância com relatos prévios (Gerez et al., 2005; Mobini Far et al., 2007; Bento Silva et al., 2010; Chuffa et al., 2011; Camargo et al., 2011, 2014; Belardin et al., 2014; Simão et al., 2015). O prejuízo no ciclo estral foi mantido após os dois períodos de recuperação nas maiores doses do esteroide, com indicação de efeito dose e período-dependente. Segundo Gervásio e colaboradores (2014), em ovários excessivamente androgênicos, pode ocorrer a hipersecreção do LH que conduz a uma anovulação crônica e a infertilidade. Em concordância, nós observamos que houve um aumento nos níveis de LH a partir da dose de 3,75 mg DN/kg após o período de tratamento e também após os períodos de recuperação de 30 e 60 dias, nos grupos de 7,5 e 15 mg DN/kg, respectivamente.

A foliculogênese e a luteogênese foram severamente prejudicadas pelo tratamento com decanoato de nandrolona, resultando na redução do peso ovariano após o período de tratamento, que se estendeu nos períodos de recuperação de 30 e 60 dias. A recuperação das características morfológicas do tecido ovariano ao 48º dia dos 60 dias pós-tratamento no grupo tratado com a menor dose do esteroide (1,87 mg DN/kg), elevou o peso do órgão de maneira similar ao do grupo controle. O mesmo não ocorreu na dose de 3,75 mg DN/kg, devido a retomada tardia da ciclicidade estral (55º dia do período de recuperação). É bem documentado que os esteroides sintéticos promovem redução no peso dos órgãos reprodutivos (Camargo et al., 2009a,b; Bento-Silva et al., 2010; Karbalay-Doust e Noorafshan, 2012; Camargo et al., 2014).

O desenvolvimento do corpo lúteo e o desenvolvimento folicular podem ser influenciados pela redução nos níveis de P4 (Lüttgenauett et al., 2011). No presente estudo, todos os grupos androgenizados apresentaram redução nos níveis séricos de P4, em comparação ao grupo controle, após o período de tratamento e de recuperação de 30 dias. No período de recuperação de 60 dias, os níveis de P4 mantiveram-se baixos nos grupos esteroidais de 7,5 e 15 mg DN/kg, e foi similar ao controle nos grupos de menor dosagem (1,87 e 3,75 mg DN/kg). Estes resultados mostram que o nível de P4 está associado com a formação ou a degeneração das estruturas luteínicas.

As alterações histopatológicas presentes nos ovários das ratas que receberam as diferentes doses de decanoato de nandrolona foram relatadas em nosso estudo prévio (Simão et al., 2015), e se assemelham às alterações observadas em ovários de pacientes transexuais que receberam altas doses de andrógeno sintético por longo período (Chada et al., 1994). Em outro estudo (Mannerås et al., 2007), ratas com 21 dias de idade foram tratadas com 7,5 mg do andrógeno não-aromatizável DHT por 90 dias (83µg diariamente) ou Letrozol (36 mg, 400µg diariamente), um inibidor da aromatase que bloqueia a conversão da T em E2. Ao final do tratamento, ambos os grupos apresentaram morfologia gonadal similar à Síndrome do Ovário Policístico (SOP), caracterizada pela numerosa população de folículos císticos e atresícos e redução no número de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos. Estas alterações ovarianas também foram observadas no presente estudo após os períodos de tratamento e recuperação. Os resultados obtidos pelos vários autores confirmam o relato de que os andrógenos são agentes prejudiciais ao tecido gonadal quando presentes em quantidades excessivas (Gervásio et al., 2014). Segundo Walters (2008), os andrógenos sintéticos exercem efeitos negativos sobre a foliculogênese, mas não é bem conhecido se estes efeitos se devem somente ao mediador AR ou também à conversão do andrógeno a outros esteroides, com potencial de exercer ações indiretas, tais como, a via ER.

Os hormônios esteroides ovarianos, incluindo andrógenos e estrógenos, influenciam o processo da foliculogênese através da interação com os receptores específicos. No presente estudo, a presença de forte marcação do AR nas células granulosas e tecais dos folículos antrais e atresicos das ratas androgenizadas confirma os resultados obtidos em ovários de pacientes transexuais que receberam andrógeno sintético e também de pacientes com SOP (Chada et al., 1994). De acordo com os autores, os resultados são consistentes com o conceito de que os andrógenos que interagem com os ARs assumem uma função essencial para o crescimento e maturação folicular, atresia e luteinização de uma maneira autócrina ou parácrina. Nossos resultados são concordantes com o relato, uma vez que o andrógeno sintético administrado em diferentes doses prejudicou o desenvolvimento folicular e a formação do corpo lúteo, e induziu uma marcante atresia folicular. Além disso, a alta expressão do AR nos ovários das ratas mesmo após os períodos de recuperação de 30 e 60 dias, demonstra que a regulação dos ARs induzida pelo decanoato de nandrolona persiste por um período considerável após a remoção do esteroide exógeno.

O ER- β é a principal forma presente nos ovários, mas ambos ERs (α e β) são importantes para a manutenção da fertilidade e função ovariana (Drummond & Fuller, 2012). Altos níveis de ER- α e ER- β são expressos nos ovários normais (Kuipper et al., 1997). No entanto, em pacientes com SOP, a expressão do ER- β é reduzida nas células granulosas e tecais (Jakimiuk et al., 2002); em modelo SOP de roedor, esta expressão também é reduzida na granulosa dos folículos císticos (Zurvarra et al., 2009). Em nosso estudo, houve alta imunomarcção do ER- β nas células foliculares dos grupos DN após os períodos de tratamento e de recuperação de 30 dias, e uma expressão dose-dependente do receptor na imunoreação do período de recuperação de 60 dias. Na análise por imunoblotting o grupo de 15 mg DN/kg foi o único a superar a expressão do controle em todos os períodos experimentais. Apesar das discrepâncias entre nossos resultados com os demais estudos quanto à imunomarcção e quantificação do ER- β , diversos fatores, tais

como, condição experimental dos ovários, tipo de andrógeno sintético empregado, níveis de andrógenos circulantes e modelo experimental devem ser considerados para eventuais comparações.

Trabalho realizado por Elias (2013) em ratas tratadas com o esteroide estanozolol (5 mg/kg no 21º dia pós-natal), mostrou que aos 30 e 60 dias de vida, houve redução na expressão do ER- α nos ovários. Os resultados do presente estudo mostraram que após o período de tratamento, a redução na expressão do ER- α ocorreu apenas nas duas menores doses do esteroide (1,87 e 3,75 mg DN/kg) na comparação com os demais grupos experimentais. Ao se avaliar os períodos de recuperação, verificou-se que após os 30 e 60 dias, todas as ratas androgenizadas apresentaram valores similares ao controle na quantidade de ER- α , exceção feita apenas pelo aumento da expressão do grupo de 1,87 mg DN/kg após os 60 dias de repouso. Além disso, o grupo de 15 mg DN/kg diferiu dos demais grupos esteroidais em ambos os períodos de recuperação. Os resultados mostram que a forma de expressão do ER- α diverge em função da dose esteroideal administrada e período avaliado. Os níveis elevados de andrógeno promovido pelo tratamento com a dose de 15 mg DN/kg impulsionaram a expressão do ER- α até o final do menor período de repouso. Após o período de recuperação de 60 dias, com a consequente diminuição dos níveis de andrógeno circulante, a expressão do receptor foi reduzida pelo grupo a um valor similar ao controle, mas inferior às demais doses do esteroide, que recuperaram a expressão do ER- α com maior antecedência em função das menores doses empregadas durante o tratamento com DN.

Os estrógenos estão envolvidos na regulação da expressão dos ERs. Elias (2013) relatou aumento nos níveis de 17 β -estradiol nas ratas pré-púberes tratadas com estanozolol. No presente estudo, os níveis do E2 aumentaram apenas nos grupos tratados com 7,5 e 15 mg DN/kg após o período de tratamento. Após o período de recuperação de 30 dias os níveis do E2 diminuíram e mantiveram-se desta maneira após o maior período de repouso. Observou-se assim, que o

aumento nos níveis de E2 não correspondeu a um acréscimo na quantidade dos receptores estrogênicos ovarianos após o período de tratamento, mas com a queda no nível hormonal houve um aumento na quantidade do ER- α nas doses esteroidais de 1,87, 3,75 e 7,5 mg DN/kg após o período de recuperação de 60 dias, e para o ER- β nas doses de 7,5 e 15 mg DN/kg nos 30 dias pós-tratamento. Os resultados sugerem que há uma *down-regulation* na expressão dos ERs pelos níveis de estrógenos dependente da dose do esteroide sintético e período considerado, pós-tratamento ou pós-recuperação.

Na esteroidogênese feminina, o processo de aromatização dos andrógenos resulta na geração de estrógenos e é mediado pela enzima citocromo P450 aromatase (CYP450). Os andrógenos regulam a expressão do mRNA e acentuam a atividade da enzima aromatase via AR (Roselli & Resko, 1993), e também atuam diretamente como substrato para a aromatase. A expressão da enzima ocorre no corpo lúteo e nas células periféricas da granulosa de folículos antrais e pré-ovulatórios, e é ausente na granulosa que circunda o antro (Stocco, 2008). Neste estudo, observou-se que após o período de tratamento, a marcação para o CYP450 nas células granulosas dos folículos antrais e atresicos variou de moderada a alta, e nas células luteínicas variou de moderada a baixa. A quantidade da enzima foi maior nos grupos androgenizados após o período de tratamento e posteriormente todos os grupos DN apresentaram expressão similar ao grupo controle no período de recuperação de 60 dias. Shiina e colaboradores (2006) sugeriram que os andrógenos não são cruciais para a expressão da aromatase *in vivo*, mas os andrógenos servem principalmente como um substrato para a síntese de estrógenos (Tetsuka et al., 1995), e o FSH é o principal indutor da atividade das células granulosas (Stocco, 2008). Neste estudo, a administração do andrógeno sintético, em doses crescentes, resultou em altos níveis séricos de T nas ratas, mas esta desregulação endócrina não foi capaz de reduzir os níveis de FSH. No entanto, houve interferência na síntese de E2 mediada pela CYP450, uma vez que após o período

de tratamento os níveis séricos do hormônio aumentaram nas doses mais altas do EAA (7,5 e 15 mg DN/kg).

No estudo de Mannerås e colaboradores (2007) as concentrações de T no plasma não foram alteradas nas ratas tratadas com o DHT, mas estiveram aumentadas no grupo Letrozol. A P4 foi diminuída em ambos os grupos experimentais e o E2 permaneceu inalterado. Em nosso estudo, o tratamento androgênico com o esteroide sintético decanoato de nandrolona, promoveu o aumento significativo na quantidade de T e de DHT nas ratas após o período de tratamento, nas doses de 7,5 e 15 mg DN/kg após o período de recuperação de 30 dias e na maior dose experimental após o período de recuperação de 60 dias. As altas concentrações desses hormônios na comparação com o controle demonstra a magnitude com que se encontravam os níveis androgênicos nas ratas após o período de tratamento, tendo em vista que grande parte da T já se encontrava em sua forma biologicamente ativa (DHT) convertida pela enzima 5α -redutase. Segundo McNatty e colaboradores (1979a,b), baixos níveis de aromatase nos folículos atrésicos promovem a conversão de andrógenos em DHT, em vez de E2, perpetuando o excesso de andrógenos. Com a interrupção do tratamento esteroideal e a metabolização dos produtos derivados do esteroide, os níveis de T e DHT diminuiram nas ratas androgenizadas de uma maneira dose e período-dependente.

Neste estudo, os níveis de FSH não foram alterados durante os períodos pós-tratamento e de recuperação por 30 dias. Apenas no maior período de repouso houve redução nos níveis de FSH nos animais que receberam a dose de 7,5 mg DN/kg. Estudos recentes têm demonstrado a capacidade dos EAA em alterar a síntese de FSH. Garevik e colaboradores (2011), mostraram que indivíduos tratados com EAA por um longo período exibiram a supressão dos níveis de FSH e LH, além de alterações no metabolismo de colesterol, mesmo após 1 ano sem receber o tratamento. Os resultados foram atribuídos ao *feedback* negativo que a nandrolona ou seus metabólitos exercem sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, relacionada ao hipogonadismo

hipogonadotrófico (Pope & Katz, 1994; Palonek et al., 1995). Da mesma forma, Bordbar e colaboradores (2014), mostraram que uma baixa dose de decanoato de nandrolona (3 mg/kg/semana) reduziu os níveis de FSH, E2 e P4 em ratas, e na dose mais alta (10 mg/kg/semana) também houve redução nos níveis de LH. No entanto, em modelo animal com SOP (Tehrani et al., 2014), obtido a partir do tratamento perinatal com T exógena, houve aumento nos níveis de T e LH, mas nenhuma alteração nos níveis de FSH, E2 e P4 na progênie adulta. Em nosso estudo, o LH mostrou-se elevado após o período de tratamento, assim como a T nas doses esteroidais de 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg, além disso o E2 esteve superior nas duas maiores doses e a P4 foi reduzida em todas as ratas androgenizadas. De maneira similar, mulheres com SOP se caracterizaram pela anovulação crônica na presença de concentrações normais de FSH e E2 (Broekmans et al., 2006) e uma secreção excessiva de LH (DeVane et al., 1975; Rebar et al., 1976).

Estes resultados com mulheres sugerem a presença de uma desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário na SOP, que é apoiado pela evidência de um aumento da sensibilidade hipofisária à estimulação com o fator de liberação de corticotrofina, resultando em um excesso de hormônio adrenocorticotrófico e resposta ao cortisol em mulheres com esta desordem (Lanzone et al., 1995). Entretanto, altas concentrações de andrógenos dessensibilizam o hipotálamo ao *feedback* negativo pela P4, sugerindo que as anormalidades na liberação de gonadotrofinas na SOP são secundárias à liberação anormal de esteroides pelos ovários, glândulas adrenais (Norman et al., 2007) e pela administração exógena de andrógenos.

Vários mecanismos têm demonstrado que a resistência à insulina pode contribuir para as anormalidades gonadotróficas e o hiperandrogenismo. Elevadas concentrações de insulina circulante reduzem os valores de SHBG, aumentando assim a biodisponibilidade de T (Nestler et al., 1991) e também podem servir como um co-fator para estimular a biossíntese de andrógeno adrenal e ovariano, contribuindo assim para a concentração anormal de gonadotrofinas (Willis et

al., 1996; Azziz et al., 2003). A insulina também pode agir diretamente no hipotálamo e na hipófise para regular a pulsatividade da liberação de gonadotrofinas (Adashi et al., 1981), mas a contribuição da resistência à insulina para a manifestação das anormalidades gonadotróficas na SOP permanece incerta (Dunaif 1997). De fato, estudos sobre a administração de anabolizantes (Cohen & Hickman, 1987) e esteroides sexuais (Woodward et al., 1981; Diamond et al., 1998) em seres humanos têm demonstrado que estes hormônios são capazes de induzir a resistência periférica à insulina. Portanto, é possível acreditar que os níveis de FSH e LH apresentados pelas ratas androgenizadas de nosso estudo, podem ter sido em função das características similares a uma SOP promovida pelo tratamento com DN em nosso procedimento experimental.

Em resumo, todas as doses de decanoato de nandrolona, do menor ao maior nível de dose, apresentaram prejuízo no ciclo estral e na estrutura histológica ovariana das ratas e as maiores doses (7,5 e 15 mg DN/kg) não restabeleceram o ciclo reprodutivo e o tecido ovariano após o maior período de interrupção do tratamento esteroideal. Além disso, o maior nível de dose do esteroide foi o que apresentou as maiores respostas na imunoexpressão dos receptores esteroidais após os períodos de tratamento e de recuperação por 30 e 60 dias. Nossos resultados permitiram associar os efeitos colaterais promovidos pelo tratamento com as diferentes doses de decanoato de nandrolona no tecido ovariano e nos níveis hormonais sexuais de forma similar as características morfofisiológicas da Síndrome dos Ovários Policísticos, além de expandir o conhecimento acerca dos complexos mecanismos envolvidos na regulação das funções ovarianas e na promoção das injúrias relacionadas ao tratamento androgênico na reprodução feminina, acompanhando ao longo do tempo a forma com que pode se dar a reversibilidade dos efeitos colaterais em função da dose administrada.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (Processos número 2012/01747-0 e 2013/14510-0) e FUNDUNESP - Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (número do processo 2178/002/14), pelo apoio financeiro.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS** 1981 Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*, **108**: 1441–49.
- Azziz R, Ehrmann DA, Legro RS, Fereshetian AG, O’Keefe M, Ghazzi MN** 2003 Troglitazone decreases adrenal androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility & Sterility*, **79**: 932–37.
- Belardin LB, Simão VA, Leite GAA, Chuffa LGA & Camargo ICC** 2014 Dose-Dependent Effects and Reversibility of the Injuries Caused by Nandrolone Decanoate in Uterine Tissue and Fertility of Rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **101**: 168-177.
- Bento-Silva MT, Martins MCC, Torres-Leal FL, Barros TL, Carvalho ILNF, Carvalho Filho HA & Almeida RFG** 2010 Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **46**: 79-89.

Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, Yarasheski KE, Sinha-Hikim I, Dzekov J, Magliano L et al. 2005 Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *Endocrinology and Metabolism*, **90**: 678-688.

Blasberg ME, Langan CJ & Clark AS 1997 The effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle. *Physiology & Behavior*, **61**: 265–272.

Boff SR 2010 Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, **18**: 81-88.

Bonetti A, Tirelli F, Catapano A, Dazzi D, Dei Cas A, Solito F, Ceda G, Reverberi C, Monica C, Pipitone S et al. 2008 Side Effects of Anabolic Androgenic Steroids Abuse. *International Journal of Sports Medicine*, **29**: 679–687.

Bordbar H, Mesbah F, Talaei T, Dehghani F & Mirkhani H 2014 Modulatory Effect of Gonadotropins on Rats' Ovaries after Nandrolone Decanoate Administration: A Stereological Study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, **39**: 44-50.

Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ & Fauser BC 2006 PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG*, **113**: 1210–17.

Camargo ICC, Souza RB, Mesquita SFP, Chuffa LGA & Frei F (2009a) Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone dcanoate and submitted to physical effort. *Acta Biologica Hungarica*. **60**: 253-261.

Camargo ICC, Gaspar ALC, Frei F & Mesquita SFP 2009b Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, **31**: 453-460.

Camargo ICC, Gênova TC, Machado MCP, Frei F & Mesquita SFP 2011 Administração experimental de esteroide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. *Bioscience Journal*, **27**: 656-665.

Camargo ICC, Leite GAA, Pinto T & Ribeiro-Paes JT 2014 Histopathological findings in the ovaries and uterus of albino female rats promoted by co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Experimental Toxicology and Pathology*, **66**: 195-202.

Chadha S, Pache TD, Huikeshoven FJM, Brinkmann AO & Van der Kwast TH 1994 Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. *Human Pathology*, **25**: 1198-1204.

Chuffa LGA, Souza RB, Frei F, Mesquita SFP & Camargo ICC 2011 Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anatomical Record*, **294**: 335-342.

Clark AS & Fast AS 1996 Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behavioral Neuroscience*, **110**: 1478-1486.

Cohen, JC & Hickman R 1987 Insulin resistance and diminished glucose tolerance in powerlifters ingesting anabolic steroids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **64**: 960-963.

Couse JF, Hewitt SC & Korach KS 2006 Chapter 15, Steroid Receptors in the Ovary and Uterus. *Knobil and Neill: Physiology of Reproduction, Third Edition* edited by Jimmy D. Neill, Academic Press, New York, 593-698.

DeVane GW, Czekala NM, Judd HL & Yen SS 1975 Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **121**: 496–500.

Diamond MP, Grainger D, Diamond MC, Sherwin RS & DeFronzo RA 1998 Effects of methyltestosterone on insulin secretion and sensitivity in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **83**: 4420-4425.

Drummond AE 2006 The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **4**: 450.

Drummond AE & Fuller PJ 2012 Ovarian actions of estrogen receptor- β : an update. *Seminars in Reproductive Medicine*, **30**: 32-38.

Dunaif A 1997 Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrinology Reviews*, **18**: 774–800.

Ehrmann DA 2005 Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, **352**: 1223-1236.

Evans NA 1997 Gym & tonic: a profile of 100 male steroid users. *Brazilian Journal of Sports Medicine*, **31**: 54–58.

Gårevik N, Strahm E, Garle M, Lundmark J, Ståhle L, Ekström L & Rane A 2011 Long term perturbation of endocrine parameters and cholesterol metabolism after discontinued abuse

of anabolic androgenic steroids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **127**: 295-300.

Gerez JR, Frei F & Camargo ICC 2005 Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception*, **72**: 77-80.

Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sá MF & Rosa-e-Silva ACJDS 2014 The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2014: 1-11.

Goldman JM, Murr AS & Cooper RL 2007 The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **80**: 84-97.

Hartgens F & Kuipers H 2004 Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Medicine*, **34**: 513-554.

Iriart JAB, Chaves JC & De Orleans RG 2009 Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cadernos de Saúde Pública*, **25**: 773-782.

Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Yen HW, Bogusiewicz M & Magoffin DA 2002 Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**: 5532-5538.

Karbalay-Doust S & Noorafshan A 2012 Stereological estimation of ovarian oocyte volume, surface area and number: application on mice treated with nandrolone decanoate. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **50**: 275-279.

Kicman AT 2008 Pharmacology of anabolic steroids. *Brazilian Journal of Pharmacology*, **154**: 502-521.

Kuiper GG, Carlsson BO, Grandien KAJ, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, **138**: 863-870.

Lanzone A, Petraglia F, Fulghesu AM, Ciampelli M, Caruso A, Mancuso S 1995 Corticotropin-releasing hormone induces an exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **63**: 1195–99.

Lima-Verde IB, Rossetto R & Figueiredo JR 2011 Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **35**: 472-482.

Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M & Stener-Victorin E 2007 A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, **148**: 3781-3791.

Maravelias C, Dona A, Stefanidou M & Spiliopoulou C 2005 Adverse effects of anabolic steroids in athletes – A Constant threat. *Toxicology Letters*, **158**: 167–175.

Marcondes FK, Bianchi FJ & Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, **62**: 609-614.

Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OH, Perez SE, Nakagaki WR, Carvalho HF, Selistre-Araujo HS 2010 Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, **21**: 91-99.

McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ 1979a The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **49**: 687-699.

McNatty KP, Makris A, Reinhold VN, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ (1979b) Metabolism of androstenedione by human ovarian tissues in vitro with particular reference to reductase and aromatase activity. *Steroids*, **34**: 429-443.

Mobini Far HR, Agren G, Lindqvist AS, Marmendal M, Fahlke C & Thiblin I 2007 Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **131**: 189-197.

Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, Clore JN & Blackard WG 1991 A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **72**: 83–89.

Norman, RJ, Dewailly D, Legro RS & Hickey TE 2007 Polycystic ovary syndrome. *The Lancet*, **370**: 685-697.

Palonek E, Gottlieb C, Garle M, Björkhem I & Carlström K 1995 Serum and urinary markers of exogenous testosterone administration. *The Journal Of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **55**: 121-127.

Pope HG & Katz DL 1994 Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use: a controlled study of 160 athletes. *Archives of General Psychiatry*, **51**: 375-382.

Reagan-Shaw S, Nihal M & Ahmad N 2007 Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, **22**: 659–661.

Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G & Naftolin F 1976 Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, **57**: 1320–29.

Roselli CE & Resko JA 1993 Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **44**: 499-508.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S & Kato S 2006 Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 224-229.

Simão VA, Berloff Belardin L, Leite GAA, Almeida Chuffa LG & Camargo ICC 2015 Effects of different doses of nandrolone decanoate on estrous cycle and ovarian tissue of rats after treatment and recovery periods. *International Journal of Experimental Pathology*, **96**: 338-349.

Stocco C 2008 Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*, **73**: 473-487.

Thiblin I & Petersson A 2004 Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: a review. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **19**: 27–44.

Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A & Azizi F 2014 Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Experimental Physiology*, **99**: 792-801.

Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD & Hillier SG 1995 Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *Journal of Endocrinology*, **145**: 535-543.

- van Amsterdam J, Opperhuizen A & Hartgens F** 2010 Adverse health effects of anabolic–androgenic steroids. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **57**: 117-123.
- Walters, KA, Allan, CM, Handelsman, DJ** 2008 Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction*. **78**: 380-389.
- Wang PH & Chang C** 2004 Androgens and ovarian cancers. *European Journal of Gynaecology and Oncology*, **25**: 157-163.
- Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S** 1996 Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **81**: 302–09.
- Woodward TS, Burghen GZ, Kitabachi AE & Wilimas JA** 1981 Glucose intolerance and insulin resistance in aplastic anaemia treated with oxymetholone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **53**: 905-908.
- Zurvarra FM, Salvetti NR, Mason JI, Velazquez MM, Alfaro NS & Ortega HH** 2009 Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reproduction, Fertility and Development*, **21**: 827-839.

Legendas e Figuras:

OBS: as figuras encontram-se traduzidas para o idioma inglês em função do preparo do manuscrito para publicação em revista internacional.

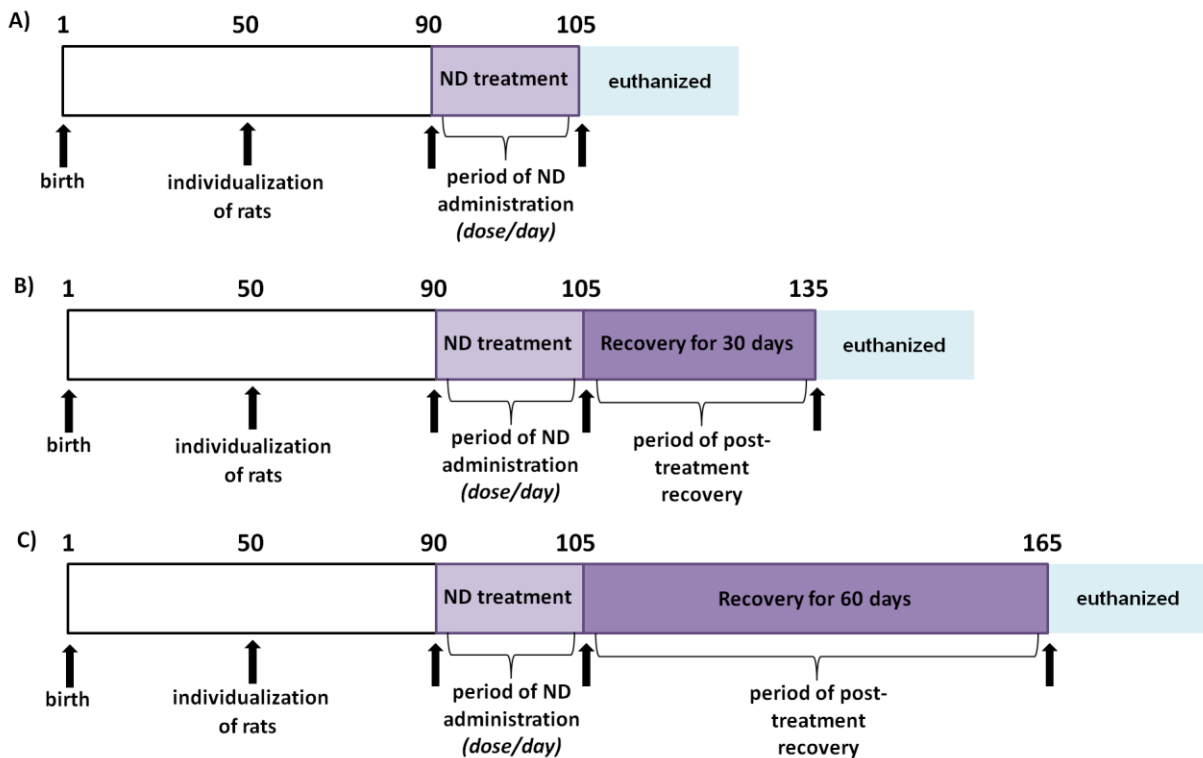


Figura 1. Esquema cronológico do delineamento experimental em dias. (A) Aos 90 dias de idade seis (6) ratas por nível de dose (1,87, 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg) foram designadas para eutanásia ao final do período de tratamento de 15 dias. (B) Seis (6) ratas por nível de dose (1,87, 3,75, 7,5, e 15 mg DN/kg) receberam o respectivo tratamento durante os 15 dias e foram mantidas em repouso no período de recuperação de 30 dias (105 a 135 de idade), seguida pela eutanásia. (C) Seis (6) ratas por nível de dose (1,87, 3,75, 7,5, e 15 mg DN/kg) receberam o respectivo tratamento durante 15 dias, e foram mantidas sem tratamento adicional durante o período de recuperação de 60 dias (105 a 165 de idade), seguida por eutanásia.

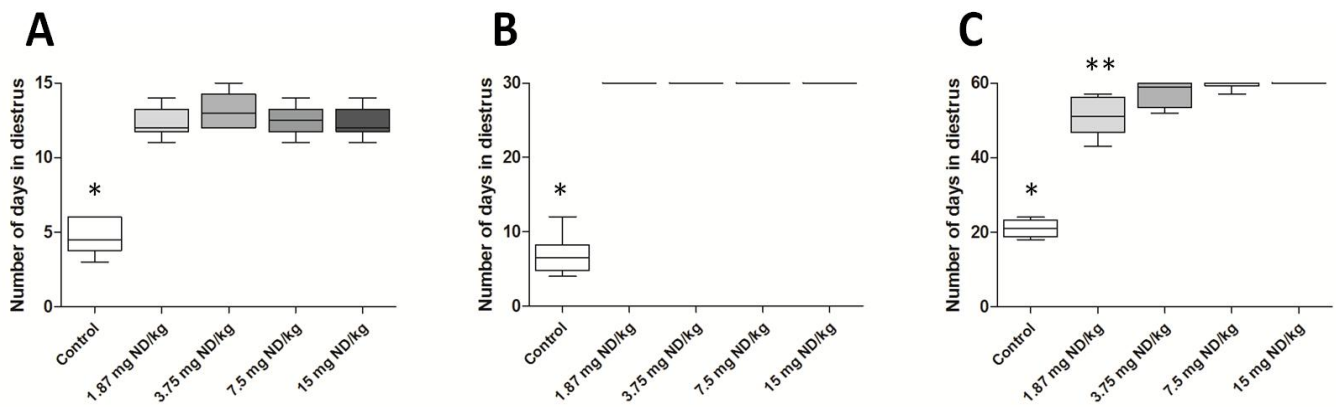


Figura 2. Número de dias em diestro nas fêmeas dos grupos tratados com DN (1,87; 3,75; 7,5; 15 mg/kg) após o período de tratamento (A), período de recuperação de 30 dias (B), e período de recuperação de 60 dias (C), comparativamente ao grupo controle de ciclo estral regular e sacrificado na fase do diestro. *Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com todos os grupos esteroidais; **Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos tratados nas doses de 3,75, 7,5 e 15 mg DN/kg. Valores expressos como média \pm erro padrão. ANOVA, teste de Tukey.

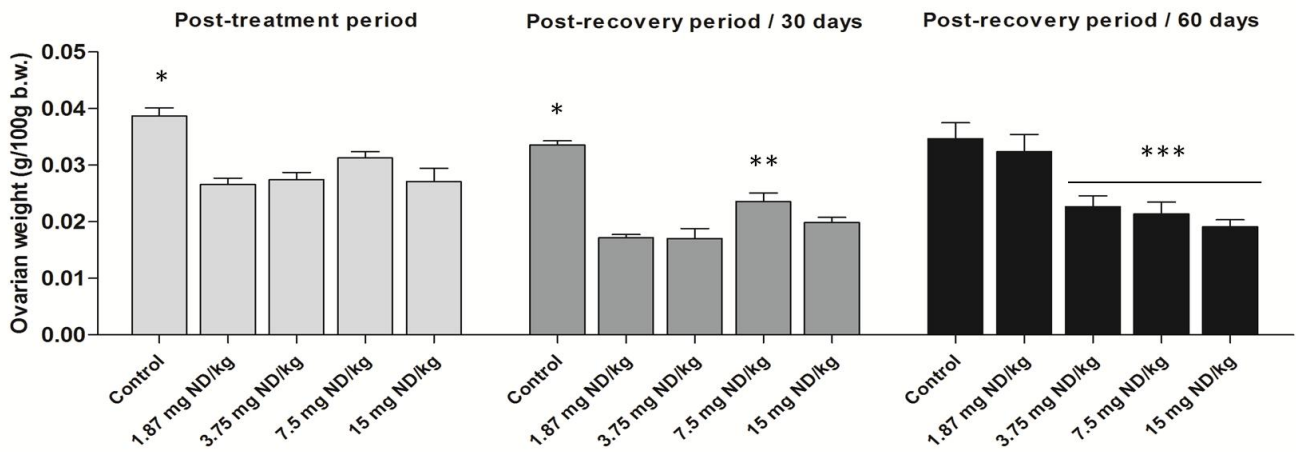


Figura 3. Representação esquemática do peso relativo ovariano das ratas do grupo controle (Control) e tratados com decanoato de nandrolona (1,87; 3,75; 7,5 e 15 mg/kg), nos diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). Valores expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). ANOVA, teste de Tukey. *Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com todos os grupos esteroidais; **Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos de 1,87 e 3,75 mg/kg; ***Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos Controle e 1,87 mg/kg.

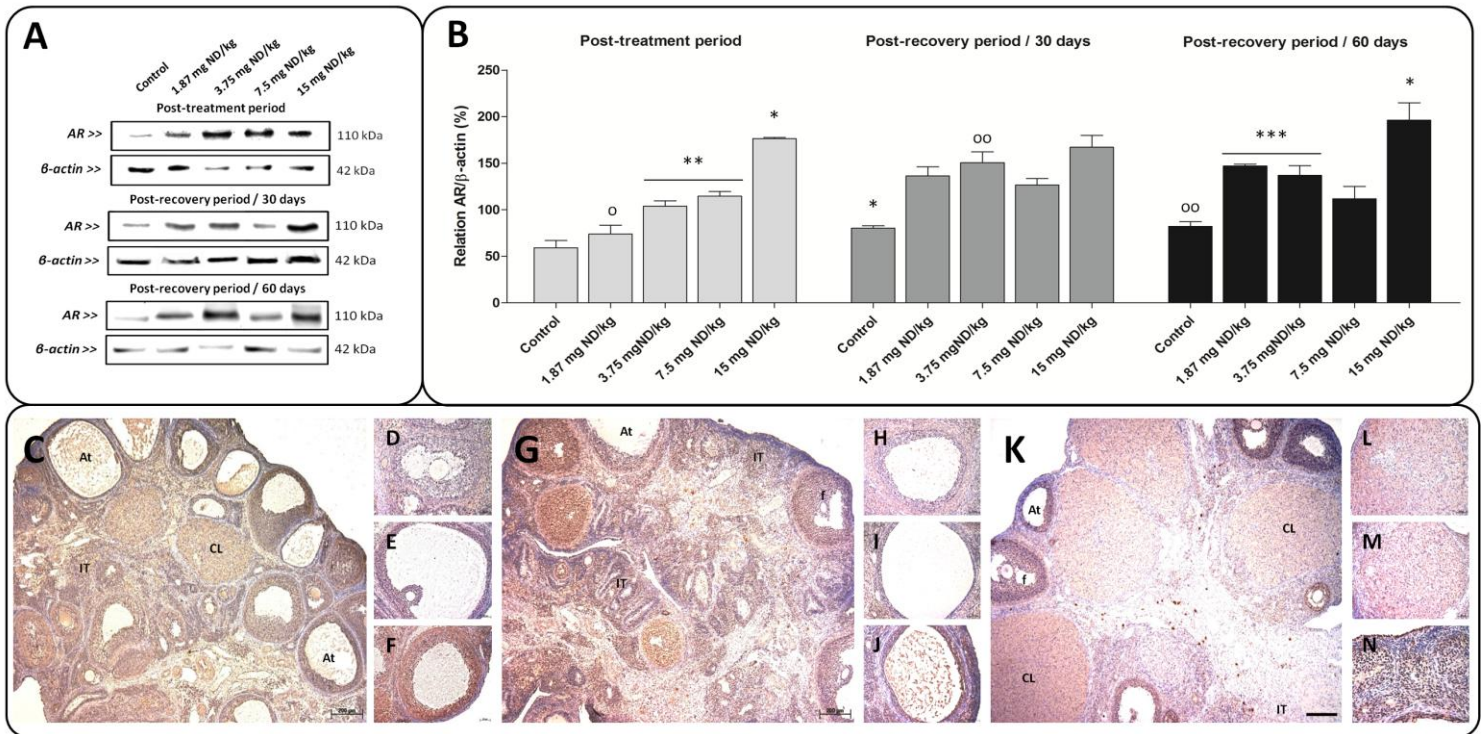


Figura 4. Análise de Western Blot e localização imunohistoquímica do AR nos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) Representação dos perfis de expressão das proteínas (70 ug) em extratos agrupados de 6 amostras/grupo. (B) Os extratos obtidos a partir das ratas individuais foram usados para análise densitométrica dos níveis de AR seguido de normalização pela β -actina. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). *Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os demais grupos do período; **Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos Controle e 1,87 mg DN/kg do período; ***Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o grupo Controle do período. ^ODiferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o respectivo grupo dos demais períodos experimentais; ^{OO}Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o respectivo grupo do período de tratamento. No período de tratamento a imunoreatividade para o AR (C-F) foi de intensidade moderada nos folículos atrésicos (At) e tecido intersticial (IT) do grupo Controle (D) e grupos que receberam 1,87 (C) e 3,75 mg DN/kg (E), e de alta intensidade na dose de 15 mg DN/kg (F). Após o período de recuperação de 30 dias a imunorreação para o AR (G-J) foi de fraca intensidade nos At do grupo Controle (H) e nos grupos DN de 1,87 (G) e 7,5 mg/kg (I) e

moderada na dose de 15 mg DN/kg (J). No período mais longo de repouso a imunorreação para o AR (F-I) foi alta principalmente nos corpos lúteos (CL) dos grupos DN de 1,87 (K) e 3,75 mg/kg (M). No grupo controle a expressão no CL foi moderada (L). No grupo de 15 mg DN/kg os corpos lúteos estiveram ausentes, mas no IT a expressão foi moderada (N). Barras = 200 μm (C, G e K) e 50 μm (D-F, H-J e L-N). Foi utilizado controle negativo.

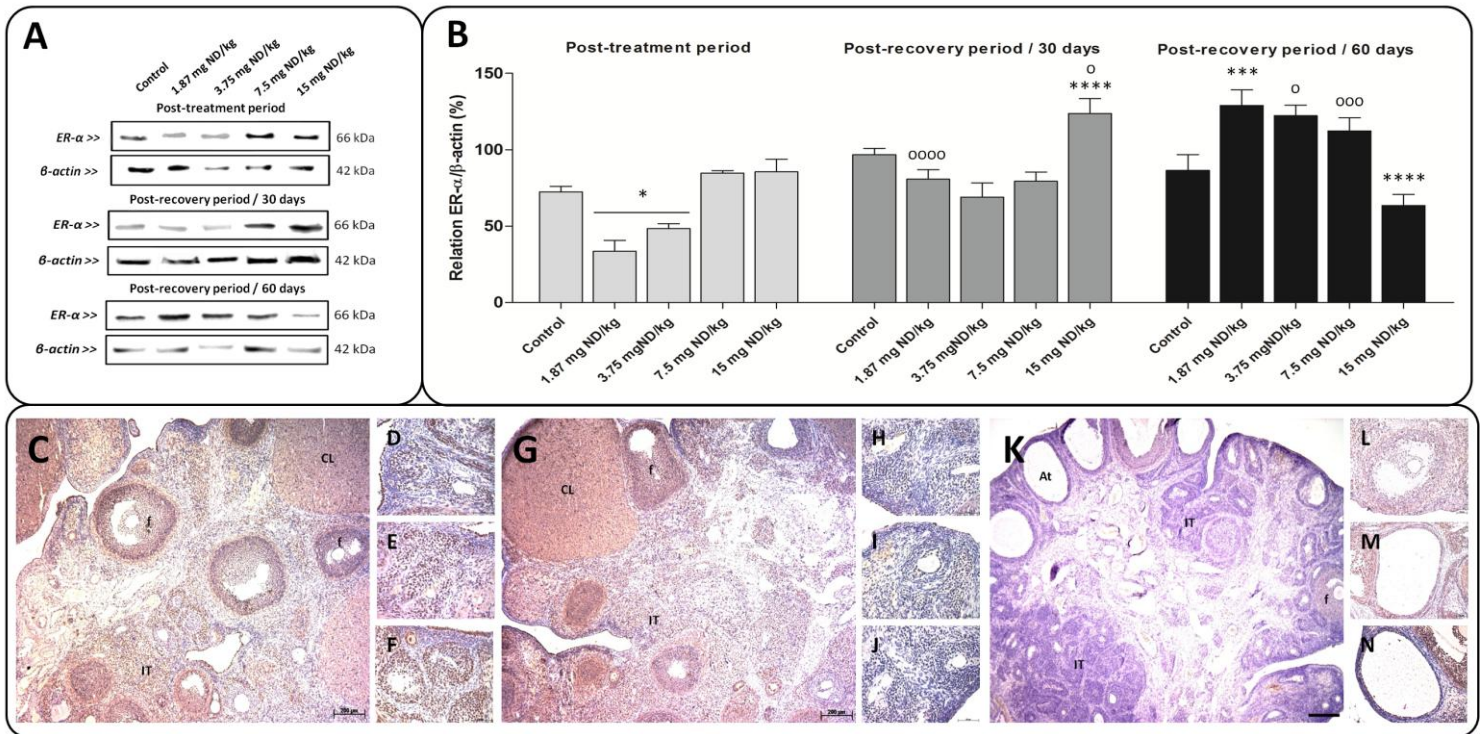


Figura 5. Análise de Western Blot e localização imunohistoquímica do ER- α nos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) Representação dos perfis de expressão das proteínas (70 ug) em extratos agrupados de 6 amostras/grupo. (B) Os extratos obtidos a partir das ratas individuais foram usados para análise densitométrica dos níveis de ER- α seguido de normalização pela β -actina. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). *Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os demais grupos do período; ***Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o grupo controle do período; ****Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os grupos de 1,87, 3,75 e 7,5 mg DN/kg do período. ^oDiferença estatística (p<0.05) na comparação com o respectivo grupo dos demais períodos experimentais; ⁰⁰⁰Diferença estatística (p<0.05) na comparação com o respectivo grupo do período de recuperação de 30 dias; ⁰⁰⁰⁰Diferença estatística (p<0.05) na comparação do mesmo grupo experimental entre todos os períodos do estudo. No período de tratamento a imunoreatividade para o ER- α (C-F) foi de intensidade moderada nos folículos atrésicos (At) e tecido intersticial (IT) do grupo Controle (D) e grupos que receberam 1,87 (C) e 3,75 mg DN/kg (E), e de alta intensidade na dose de 15 mg DN/kg (F). Após o

período de recuperação de 30 dias a imunomarcção do ER- α no IT foi de intensidade baixa nos grupos androgenizados de 1,87 (H), 3,75 (I) e 7,5 mg DN/kg (J), enquanto que foi moderada no Controle (G). Já após o período de recuperação de 60 dias, a imunomarcção para o ER- α apresentou intensidade moderada nos At dos grupos de 1,87 (M) e 3,75 mg DN/kg (N), de forma similar ao grupo controle (L), enquanto que houve fraca intensidade no grupo de 15 mg DN/kg (K). Barras = 200 μ m (C, G e K) e 50 μ m (D-F, H-J e L-N). Foi utilizado controle negativo.

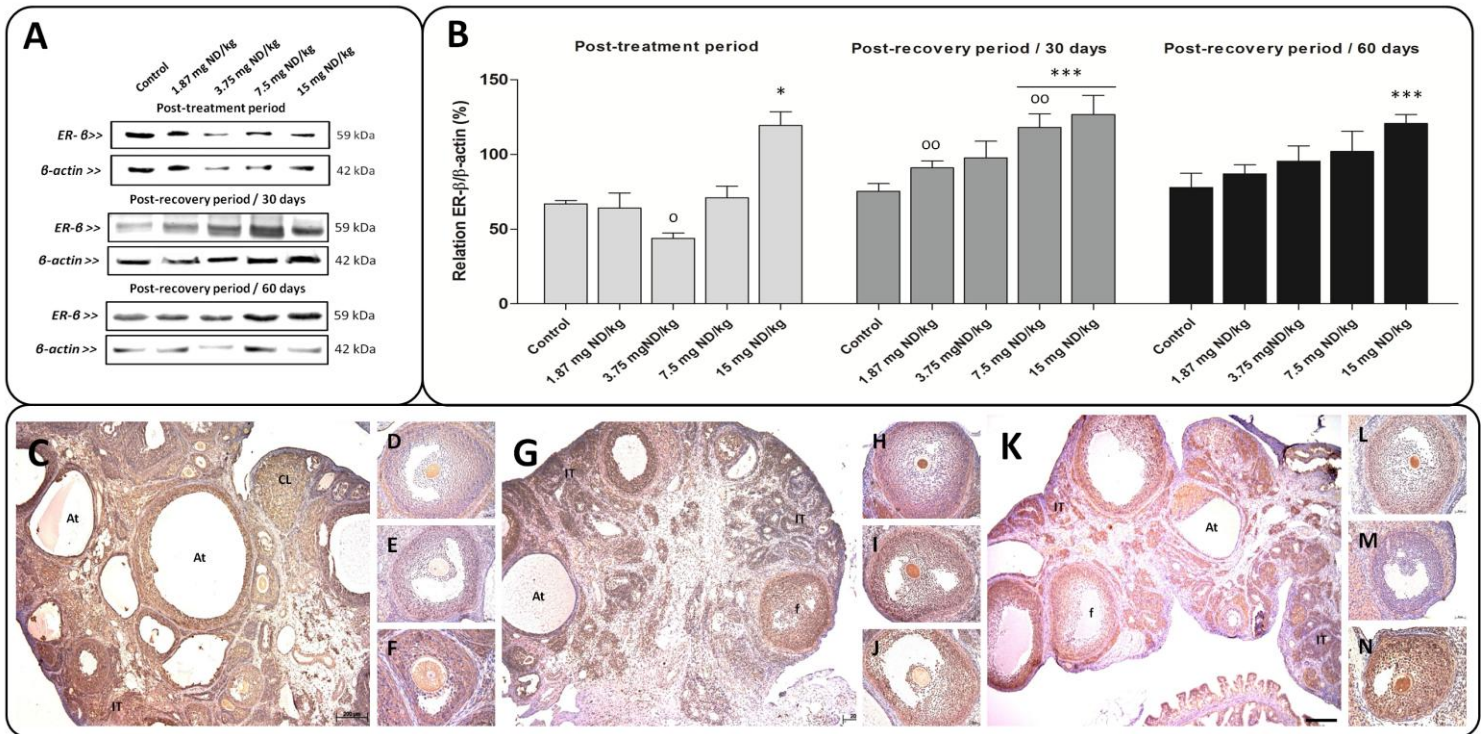


Figura 6. Análise de Western Blot e localização imunohistoquímica do ER- β nos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) Representação dos perfis de expressão das proteínas (70 ug) em extratos agrupados de 6 amostras/grupo. (B) Os extratos obtidos a partir das ratas individuais foram usados para análise densitométrica dos níveis de ER- β seguido de normalização pela β -actina. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). *Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os demais grupos do período; ***Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o grupo Controle do período. ^oDiferença estatística (p<0,05) na comparação com o respectivo grupo dos demais períodos experimentais; ^{oo}Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o respectivo grupo do período de tratamento. No período de tratamento houve marcante imunomarcção para o ER- β no tecido ovariano das ratas do grupo de 15 mg DN/kg (C). Nos folículos antrais dos grupos de 3,75 (E) e 7,5 mg DN/kg (F), a intensidade de expressão do ER- β foi alta e no controle foi moderada (D). Após o período de recuperação de 30 dias a imunoreatividade para o ER- β manteve-se elevada nos grupos androgenizados (G, I e J). A expressão nuclear das células granulosa dos folículos antrais dos grupos de 1,87 (I), 3,75 (J) e 7,5 mg DN/kg

(G), apresentaram alta marcação no período, enquanto no grupo controle a expressão no citoplasma das células foi moderada e a nuclear ausente (H). Após os 60 dias de repouso a imunomarcação do ER- β nos folículos antrais foi de fraca intensidade no grupo de 1,87 mg DN/kg (M), moderada intensidade no grupo de 7,5 mg DN/kg (K, estrutura f) e alta intensidade nos grupos controle (L) e tratado com 15 mg DN/kg (N). Barras = 200 μ m (C, G e K) e 50 μ m (D-F, H-J e L-N). Foi utilizado controle negativo.

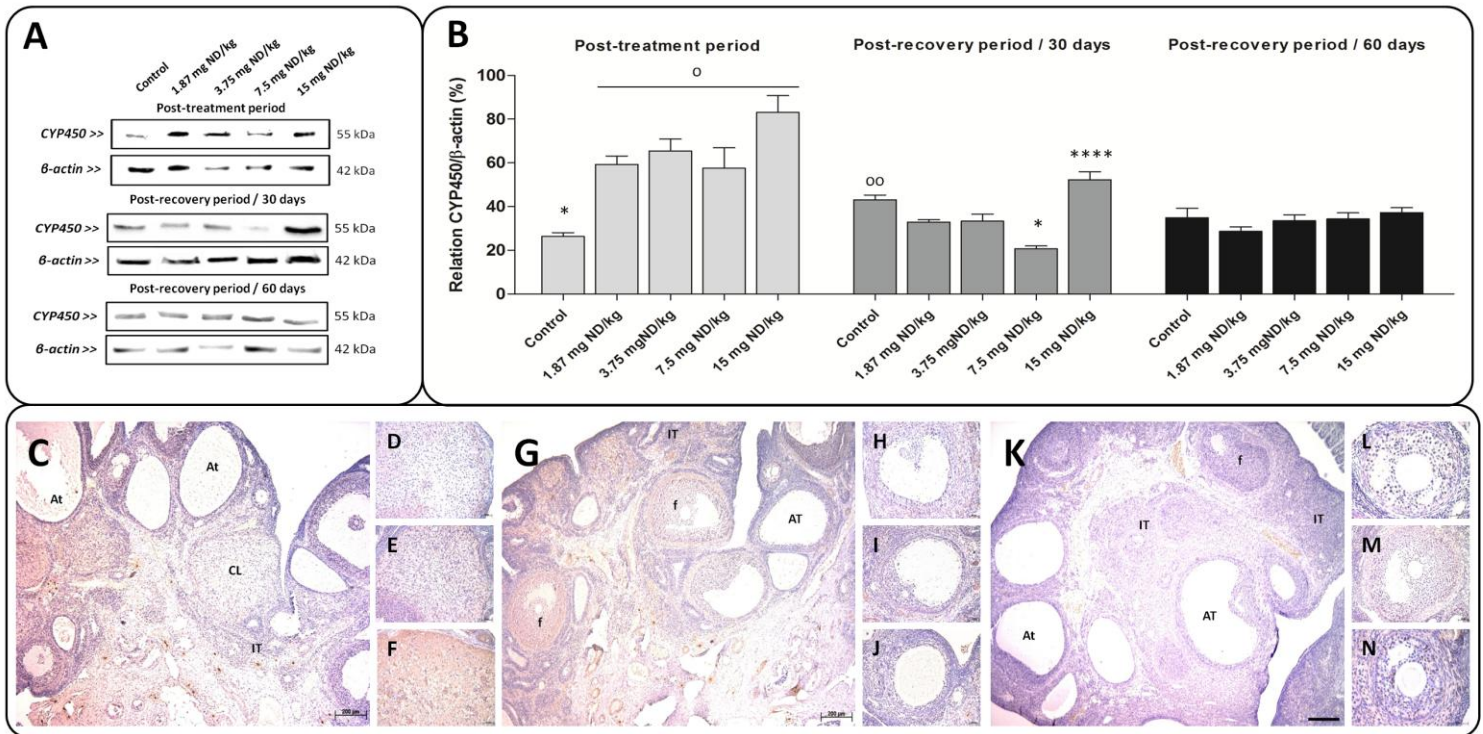


Figura 7. Análise de Western Blot e localização imunohistoquímica do CYP450 nos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) Representação dos perfis de expressão das proteínas (70 ug) em extratos agrupados de 6 amostras/grupo. (B) Os extratos obtidos a partir das ratas individuais foram usados para análise densitométrica dos níveis de CYP450 seguido de normalização pela β -actina. Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). *Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os demais grupos do período; ****Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos de 1,87, 3,75 e 7,5 mg DN/kg do período. ^oDiferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o respectivo grupo dos demais períodos experimentais; ^{oo}Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o respectivo grupo do período de tratamento. No período de tratamento a imunoreatividade moderada para o CYP450 foi apresentada nas diversas estruturas ovarianas (C), tais como nos corpos lúteos (CL) dos grupos tratados com 1,87 (E) e 7,5 mg DN/kg (C), no controle a expressão de forma geral, assim como nos CL, foi baixa (D), enquanto que no grupo de 15 mg DN/kg (F) a intensidade foi alta. Após o período de recuperação de 30 dias uma redução na imunomarcagem para o CYP450 foi observada nos grupos esteroidais, particularmente nos

folículos atrésicos (At) das doses de 1,87 (I) e 7,5 mg DN/kg (J) cuja intensidade de expressão foi fraca. Nos grupos controle (H) e tratado com 15 mg DN/kg (G) a expressão foi moderada. Após o período de recuperação de 60 dias a imunorreação do CYP450 mostrou fraca expressão nos folículos antrais (f) dos grupos de 3,75 (K) e 7,5 mg DN/kg (M), similarmente ao grupo controle (L). No grupo de 15 mg DN/kg (N) a expressão foi moderada. Barras = 200 μm (C, G e K) e 50 μm (D-F, H-J e L-N). Foi utilizado controle negativo.

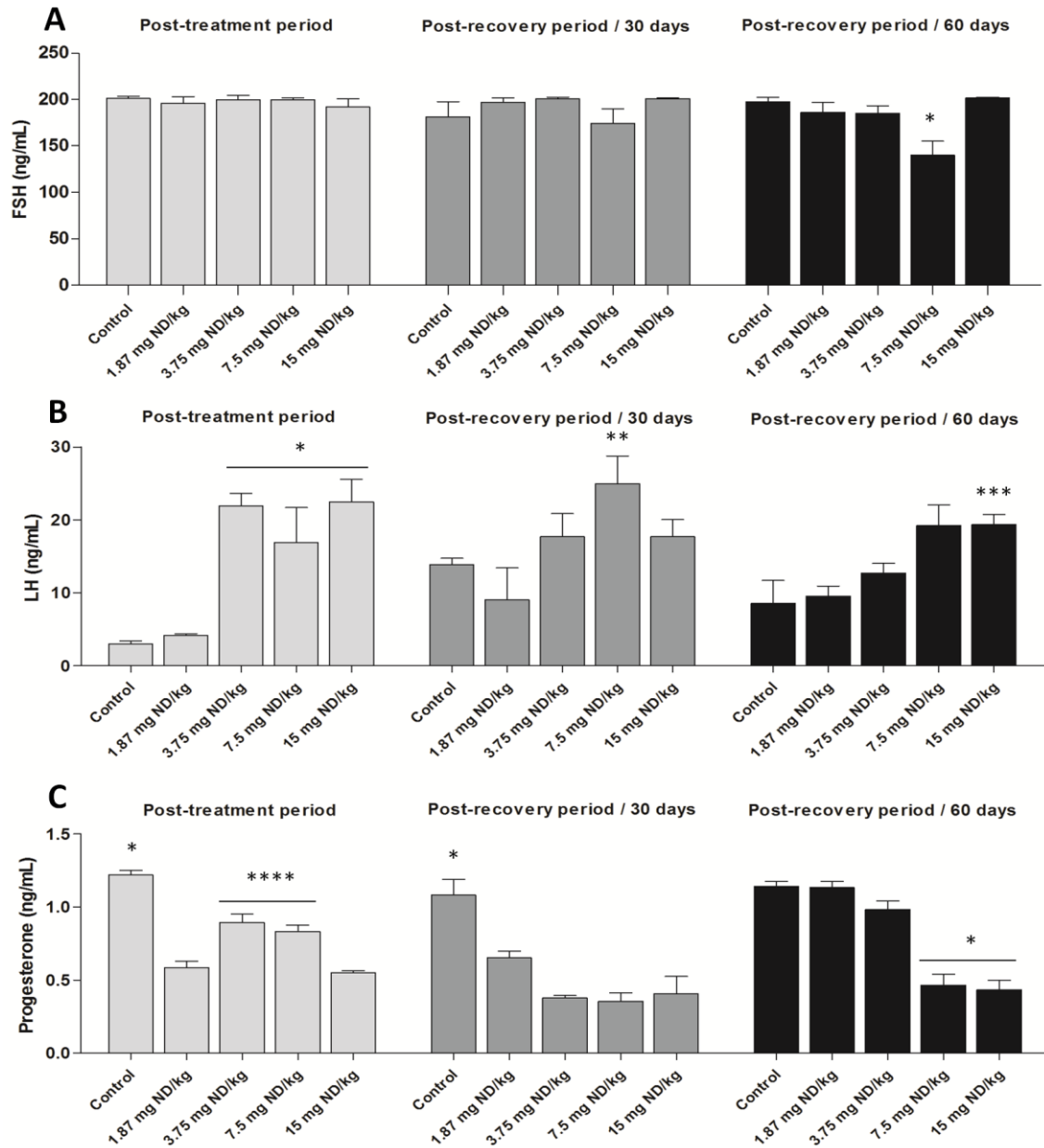


Figura 8. Perfil hormonal dos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) níveis de FSH (ng/mL); (B) níveis de LH (ng/mL) e (C) níveis de Progesterona (ng/mL). Valores expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). ANOVA, teste de Tukey. *Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os demais grupos; **Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o grupo de 1,87 mg DN/kg; ***Diferença estatística (p<0,05) na comparação com o Controle; ****Diferença estatística (p<0,05) na comparação com os grupos de 1,87 e 15 mg DN/kg.

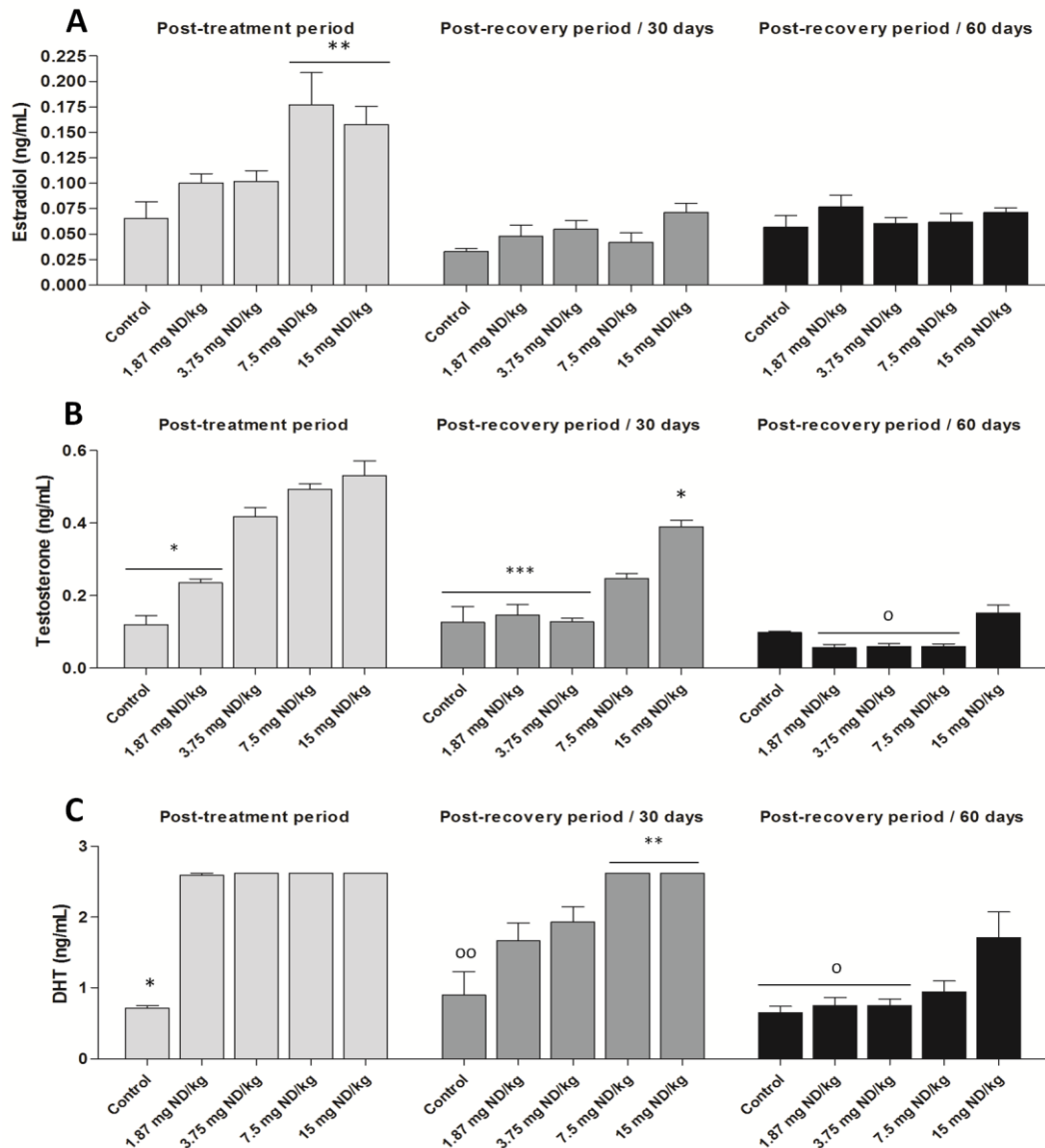


Figura 9. Perfil hormonal dos grupos experimentais após os diferentes períodos do estudo (Post-treatment period, Post-recovery period / 30 days e Post-recovery period / 60 days). (A) níveis de Estradiol (ng/mL); (B) níveis de Testosterona (ng/mL) e (C) níveis de DHT (ng/mL). Valores expressos como média \pm erro padrão (n= 6 animais/grupo). ANOVA, teste de Tukey. *Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os demais grupos do período; **Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o grupo controle; ***Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos de 7,5 e 15 mg ND/kg; ****Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com os grupos de 1,87 mg ND/kg; °Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o grupo de 15 mg ND/kg; °°Diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o grupo de 3,75, 7,5 e 15 mg ND/kg;

IV. CONCLUSÃO GERAL

Todas as doses de decanoato de nandrolona, do menor ao maior nível de dose, apresentaram prejuízo no ciclo estral, na estrutura histológica ovariana e uterina e na capacidade reprodutiva das ratas. As maiores doses (7,5 e 15 mg DN/kg) não restabeleceram o ciclo reprodutivo e as características normais do tecido ovariano e uterino mesmo após o maior período de interrupção do tratamento esteroide (pós-recuperação de 60 dias). O efeito do anabolizante indica que os mecanismos que participam da regulação hormônio-receptor no tecido ovariano variam em função da dose de esteroide empregada, após os períodos de tratamento e de recuperação. Os resultados indicam que há um complexo mecanismo envolvido na regulação das funções ovarianas, o qual requer a interação de hormônios, receptores ovarianos (tais como os AR e ER's) e outras moléculas sinalizadoras que poderão possibilitar com a interrupção por um longo período de tempo do tratamento esteroide, a recuperação das características reprodutivas de maneira dose e período-dependente.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARLT, W. Androgen therapy in women. *European Journal of Endocrinology*, v.154, p. 1-11, 2006.

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

BELARDIN, L.B.; SIMÃO, V.A.; LEITE, G.A.A.; CHUFFA, L.G.A.; CAMARGO, I.C.C. Dose-dependent effects and reversibility of the injuries caused by Nandrolone Decanoate in uterine tissue and fertility of rats. *Birth Defects Research (Part B): Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 101, p. 168-177, 2014.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. As glândulas reprodutoras. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N. *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 910-956, 2000.

BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A.J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, v. 133, p. 2204-2212, 1993.

BONETTI, A.; TIRELLI, F.; CATAPANO, A.; DAZZI, D.; DEI CAS, A.; SOLITO, F.; CEDA, G.; REVERBERI, C.; MONICA, C.; PIPITONE, S.; ELIA, G.; SPATTINI, M.; MAGNATI, M. Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. *Internacional Journal Sports Medicine*, v.29, p. 679–687, 2007.

BRODOWSKA, A.; BRODOWSKI, J.; LASZCZYNSKA, M.; STUCZANOWSKA-GLABOWSKA, S.; RUMIANOWSKI, B.; ROTTER, I.; STARCZEWSKI, A.; RATAJCZAK, M. Immunoexpression of aromatase cytochrome P450 and 17 β -hydroxysteroid

dehydrogenase in women's ovaries after menopause. *Journal of Ovarian Research*, v. 7, p. 1-7, 2014.

CALZADA, L.; J. TORRES-CALLEJA, J.; MARTINEZ, J.M.; PEDRÓN, N. Measurement of androgen and estrogen receptors in breast tissue from subjects with anabolic steroid-dependent gynecomastia. *Life Sciences*, v.69, p. 1465-1469, 2001.

CAMARGO, I.C.C.; LEITE, G.A.A.; PINTO, T.; RIBEIRO-PAES, J.T. Histopathological findings in the ovaries and uterus of female albino rats after co-administration of synthetic steroids and nicotine. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 66, n. 4, p. 195-202, 2014.

CAMARGO, I.C.C.; GÊNNOVA, T.C.; MACHADO, M.C.P.; FREI F.; MESQUITA, S.F.P. Administração experimental de esteróide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas. *Bioscience Journal*, v.27, p. 656-665, 2011.

CAMARGO, I.C.C.; SOUZA, R.B.; MESQUITA, S.F.P.; CHUFFA, L.G.A.; FREI, F. Ovarian histology and follicular score in female rats treated with nandrolone decanoate and submitted to physical effort. *Acta Biologica Hungarica*, v.60, p. 253-261, 2009a.

CAMARGO, I.C.C.; GASPAR, A.L.C.; FREI, F.; MESQUITA, S.F.P. Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.31, p.453-460, 2009b.

CANNAVÒ, S.; CURTÒ, L.; TRIMARCHI, F. Exercise-related female reproductive dysfunction. *Journal Endocrinology Invest*, v.24, p. 823–832, 2001.

CARREAU, S., BOURGUIBA, S.; LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; GENISSEL, C.; LEVALLET, J. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 193, p.137-143, 2002.

CHADHA, S.; PACHE, T.D.; HUIKESHOVEN, F.J.M.; BRINKMANN, A.O.; VAN DER KWAST, T.H. Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. *Human Pathology*, v. 25, p. 1198-1204, 1994.

CHUFFA, L.G.; SOUZA, R.B.; FREI, F.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. Nandrolone decanoate and physical effort: histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. *Anatomical Records, Part A*, v. 294, p. 335-341, 2011a.

CHUFFA, L.G.; SEIVA, F.R.; FÁVARO, W.J.; AMORIM, J.P.; TEIXEIRA, G.R.; MENDES, L.O.; FIORUCI-FONTANELLI, B.A.; PINHEIRO, P.F.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reproductive Toxicology*, v.39, p. 40-49, 2013.

CLARK, A.S.; FAST, A.S. Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behavior Neuroscience*, v. 110, p. 1478-1486, 1996.

CLARK, A.S.; COSTINE, B.A.; JONES, B.L.; KELTON-REHKOPF, M.C.; MEERTS, S.H.; NUTBROWN-GREENE, L.L.; PENATTI, C.A.A.; PORTER, D.M.; YANG, P.; HENDERSON, L.P. Sex-and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on

reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions. *Brain Research*, v. 1126, p. 122-138, 2006.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Drugs and sport research findings and limitations. *Sports Medicine*, v. 24, p. 366-384, 1997.

CONWAY, B.A.; MAHESH, V.B.; MILLS, T.M. Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intact immature female rats primed with PMSG. *Journals of Reproduction e Fertility*, v. 90, p.267-277, 1990.

COOKE, I.; O'BRIEN, M.; CHARNOCK, F.M.; GROOME, N.; GANESAN, T.S. Inhibin as a marker for ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, v. 71, p. 1046-1050, 1995.

CUNHA, T.S.; CUNHA, N.S.; MOURA, M.J.C.S.; MARCONDES, F.K. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, p. 165-179, 2004.

DE LIMA, C.; CARDOSO, F.B. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.9, p. 39-46, 2011.

DRUMMOND, A.E.; BRITT, K.L.; DYSON, M.; JONES, M.E.; KERR, J.B.; O'DONNELL, L.; SIMPSON, E.R.; FINDLAY, J.K. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 191, p. 27-33, 2002.

EVANS, N.A. Current conceptions in anabolic-androgenic steroids. *The American Journal of Sports Medicine*, v. 32, p. 534-542, 2004.

FERMO, R. S.; REGO, J. N. I.; FRANQUINI, J. V. M.; ANDRADE, T. U. Efeito da suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em ratos. *Revista Eletrônica Farmacêutica*, v. 5, p. 111-121, 2008.

GEREZ, J. R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception*, v. 72, p. 77-80, 2005.

HAYES, F.J.; HALL, J.F.; BOEPPLE, P.A.; CROWLEY, W.F. JR. Differential control of gonadotropins secretion in the human: endocrine role of inhibin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, p. 1835-1841, 1998.

HEWITT, S.C.; COUSE, J.F.; KORACH, K. Estrogen receptor transcription and transactivation. Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Research*, v. 2, p. 345-352, 2000

HOFFMAN, J. R; RATAMESS, N. A. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated? *Journal of Sports Science and Medicine*, v. 5, p. 182-193, 2006.

ICHIHARA, I.; KAWAMURA, H.; NAKANO, T.; PELLINIEMI, L.I. Ultrastructural, morphometric, and hormonal analysis of effects of testosterone treatment on Leydig cells and other interstitial cells in young adult rats. *Annals of Anatomy*, v. 183, p. 413–426, 2001.

JAKIMIUK, A.J.; WEITSMAN, S.R.; YEN, H.W.; BOGUSIEWICZ, M.; MAGOFFIN, D.A. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women

with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, p.5532-5538, 2002.

KAM, P. C. A.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*, v. 60, p. 685–692, 2005.

KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 502-21, 2008.

KIRILOVAS, D.; CHAJDA, A.; BERGSTROM, M.; BERGSTROM-PETTERMAN, E.; CARLSTROM, K.; NOSENKA, J.; KORNIYENKO, S.; YAKOVETS, A.; MOGILEVKINA, I.; NAESSEN, T. Granulosa cell aromatase enzyme activity: effects of follicular fluid from patients with polycystic ovary syndrome, using aromatase conversion and [11C] vorozole-binding assays. *Gynecological Endocrinology*, v. 22, p. 685-691, 2006.

KLEIN, N.A.; ILLINGWORTH, P.J.; GROOME, N.P.; MCNEILLY, A.S.; BATTAGLIA, D.E.; SOULES, M.R. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 81, p. 2742-2745, 1996.

KUTSCHER, E.C.; LUND, B.C.; PERRY, P.J. Anabolic steroids: A review for the clinician. *Sports Medicine*, v. 32, p. 285-296, 2002.

LISE, M.L.Z.; GAMA SILVA, T.S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T. O abuso de esteroides anabólico androgênicos em atletismo. *Revista Associação Médica Brasileira*, v. 45, p. 364-370, 1999.

LOCKWOOD, G.M.; MUTTUKRISHNA, S.; GROOME, N.P.; MATTHEWS, D.R.; LEDGER, W.L. Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, p. 1730-1735, 1998.

LUISI, S.; FLORIO, P.; REIS, F.M.; PETRAGLIA, F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 123-135, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, p. 609-614, 2002.

MATSUMOTO, T.; SHIINA, H.; KAWANO, H.; SATO, T.; KATO, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 109, p.236-241, 2008

MENDEZ, C.; MORALES-VASQUEZ, F.; PEREZ-MONTIEL, D.; GOMORA, M.J.; ESPINOLA-ZETINA, C.; HERANDEZ-MARTINEZ, A.; LOPEZ-BASAVE, H.; PEDERNERA, E. Estrogen and androgen receptor expression in surface epithelium and inclusion cyst in the ovary of premenopausal and postmenopausal women. *Journal of Ovarian Research*, v. 6, p. 1-5, 2013.

MOBINI FAR, H.R.; AGREN, G.; LINDQVIST, A.S.; MARMENDAL, M.; FAHLKE, C.; THIBLIN, I. Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in

reproductive capacity. *European Journal Obstetric Gynecology Reproductive Biology*, v. 131, p. 189-197, 2007.

MOM, C.H.; ENGELEN, M.J.A.; WILLEMSE, P.H.B.; GIETEMA, J.A.; TEN HOOR, K.A.; VRIES, E.G.E.; VAN DER ZEE, A.G.J. Granulosa cell tumors of the ovary: The clinical value of serum inhibin A and B levels in a large single center cohort. *Gynecologic Oncology*, v. 105, p. 365-372, 2007.

O'SULLIVAN, A.J. Anabolic-androgenic steroids: medical assessment of present, past and potential users. *Medical Journal of Australia*, v. 173, p. 323–327, 2000.

PERRY, P. J.; LUND, B. C; DENINGER, M.J; KUTSCHER, E.C; SCHNEIDER, J. Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey and drug utilization. *Clinic Journal Sport Medicine*, v. 15, p. 326-330, 2005.

ROBERTSON, D.M.; STEPHENSON, T.; PRUYERS, E.; BURGER, H.G.; MCCLOUD, P.; TSIGOS, A.; GROOME, N.; MAMERS, P.; MCNEILAGE, J.; JOBLING, T.; HEALY, D. Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 191, p. 97-103, 2002.

ROBERTSON, D.M.; PRUYERS, E.; BURGER, H.G.; JOBLING, T.; MCNEILAGE, J.; HEALY, D. Inhibins and ovarian cancer., *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 225, p. 65-71, 2004.

ROBERTSON, D.M.; PRUYERS, E.; JOBLING, T. Inhibin as a diagnostic marker for ovarian cancer. *Cancer Letters*, v. 249, p. 14-17, 2007.

ROSELLI, C.E.; RESKO, J.A. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 44, p. 499-508, 1993.

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

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 8, p. 235-243, 2002.

SILVA, P. R. P.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P.; PRESTES, M. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 51, p. 104-110, 2007.

SIMÃO, V.A.; BELARDIN, L.B.; LEITE, G.A.A.; CHUFFA, L.G.A.; CAMARGO, I.C.C. Dose- and period-dependent reversibility of side effects promoted by nandrolone decanoate in the estrous cycle and ovarian tissue of rats. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 96, p. 338-349, 2015.

SZOLTYS, M.; SLOMCZYNSKA, M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes*, v. 108, p.228-234, 2000.

TETSUKA, M.; WHITELAW, P.F.; BREMMER, W.J.; MILLAR, M.R.; SMYTH, C.D.; HILLIER, S.G. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *Journal of Endocrinology*, v. 145, p. 535-543, 1995.

THIBLIN, I.; PETERSSON, A. Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: a review. *Fundamentals Clinic Pharmacology*, v. 19, p. 27–44, 2005.

TIBBETTS, T.A.; MENDOZA-MENESES, M.; O'MALLEY, B.W.; CONNEELY, O.M. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1143-1152, 1998.

YAMOTO, M.; MINAMI, S.; NAKANO, R.; KOBAYASHI, M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 74, p. 989-993, 1992.

WALENTOWICZ, P.; KRINTUS, M.; SADLECKI, P.; GRABIEC, M.; MANKOWSKA-CYL, A.; SOKUP A.; WALENTOWICZ-SADLECKA, M. Serum inhibin A and inhibin B levels in epithelial ovarian cancer patients. *Plos One*, v. 9, p. 1-7, 2014.

WALTERS, K.A.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J. Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction*, v. 78, p. 380-389, 2008.

WANG, P.H.; CHANG, C. Androgens and ovarian cancers. *European Journal of Gynaecology and Oncology*, v. 25, p. 157-163, 2004.

YESALIS, C.E.; BAHRKE, M.S.; KOPSTEIN, A.N.; BARSUKIEWICZ, C.K. Incidence of anabolic steroids use: a discussion of methodological issues. *In: Anabolic Steroids in Sport and Exercise*. Second Edition. Edited by Yesalis CE. *Champaign: Human Kinetics*; 73-115, 2000.

VI. ANEXOS

Reproduction Instructions for Authors

- Scope
- Editorial policy
- Translated Abstracts
- Ethics
- Open Access and archiving in online repositories
- Copyright
- Permissions
- Article types
 - Reviews
 - Research articles
 - Debates
- Submission
 - Charges to authors
- Preparation of manuscripts
 - General
 - Gene and protein nomenclature
 - Title page
 - Abstract
 - Introduction
 - Materials and Methods
 - Declaration of interest, Funding and Acknowledgements
 - References
 - Tables
 - Figures
- Supplementary data
- Reprints
- Cover art competition
- Article promotion

■ Selezione o idioma ▼

Scope

Reproduction is the official journal of the Society of Reproduction and Fertility (SRF). It was formed in 2001 when the Society merged its two journals, the Journal of Reproduction and Fertility and Reviews of Reproduction.

Reproduction publishes original research articles, Debates and topical reviews on the subject of reproductive biology and medicine. Its focus is on cellular and molecular biology of reproduction, including the development of gametes and early embryos in all animal species including the human; developmental processes such as cell differentiation, morphogenesis and related regulatory mechanisms in normal and disease models; assisted reproductive technologies in model systems and in a human clinical environment; reproductive endocrinology; reproductive immunology; and reproductive physiology. Additional topics including cloning, the biology of embryonic stem cells, environmental effects on reproductive potential and health (e.g. obesity, endocrine disruptors), and epigenetic effects on reproductive and developmental processes are encouraged.

Editorial policy

There are no page charges and colour is free.

Reproduction publishes research articles that extend our understanding of mechanisms of reproductive biology and medicine. Articles of a descriptive or technical nature will only be published when they open new lines of research and are of interest to the wide readership of the journal. The journal does not normally publish clinical studies unless they advance our understanding of the underlying causes and/or mechanisms of disease.

Articles that are not within the remit of the journal will be rejected without full peer review. Such decisions will be taken by two editors, normally within a week of submission. A brief explanation as to why the manuscript does not meet the journal's requirements for publication will be provided.

Articles must not be submitted for publication elsewhere until the journal has reached a decision on whether to publish the article. If rejected the authors are free to submit elsewhere; if accepted the assurance automatically extends indefinitely.

Translated Abstracts

Reproduction is inviting authors to submit abstracts in major European languages and official languages from major contributing countries. This will allow authors to increase the reach and usage of their research published in Reproduction. Languages currently invited for translated abstracts include Chinese, French, Italian, Spanish, Portuguese, German, Finnish, Korean, Russian, Ukrainian, Japanese, Hebrew, Persian and Hindi. We intend to add further languages following the launch of this initiative. Authors wishing to include an abstract in their native language should submit an extra word document including the title, abstract and keywords in one language of their choice. This text will be checked for accuracy by members of the Editorial Board or Language Advisors and will be published online as part of the article's record on the journal website, should the manuscript be accepted for publication.

Ethics

All authors must abide by the standards outlined in the journal's [ethical guidelines](#). In particular, please note the need to avoid duplicate submission, plagiarism and self-plagiarism. Reproduction is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)).

BioScientifica is a member of [CrossCheck](#) (powered by iThenticate). CrossCheck is a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality. Manuscript submissions will be screened against the CrossCheck database.



The [iThenticate](#) system is also available to researchers, enabling authors to verify originality prior to submission. Please note that screening is not a requirement for submission, but may assist authors to avoid plagiarism/self-plagiarism. Originality of the manuscript submitted is the author's responsibility.



It will be assumed that submitted manuscripts carry the approval of all the authors.

Any changes to the authorship of the manuscript during the peer review process require the complete agreement of all authors in writing, as per the [Committee on Publication Ethics \(COPE\) guidelines](#).

Open Access and archiving in online repositories

The journal also offers an [Open Access option](#).

NIH funded papers

The journal automatically deposits articles (final, accepted version) to PubMed Central on behalf of authors who are NIH funded, for release 12 months from publication, enabling authors to comply with the NIH Public Access Policy.

Copyright

Articles are considered on the understanding that, if they are accepted for publication, the entire copyright shall pass to the Society for Reproduction and Fertility. The corresponding author is requested to digitally sign a copyright transfer agreement to this effect.

(Please note that when the Open Access option has been taken, copyright remains with the author(s).)

Permissions

It is your responsibility to clear all copyright permissions for any work reproduced in your article and to pay any permissions fees.

If a figure/table is adapted or reproduced from a previously published work, please include wording to this effect and a citation to the original work in the figure legend. Please forward permission from the copyright holder (usually the publisher) to the editorial office with your submission.

For information on how to request permission to reproduce any part of an article published in Reproduction see the journal's [permissions and commercial reprints page](#).

Article types

Reviews

Reproduction publishes reviews on basic mechanisms, recent developments and new hypotheses in reproductive biology. Review articles are made freely available on the journal's website immediately upon publication.

Articles are commissioned by the Reviews Commissioning Group and undergo peer review by experts in the field. If you would like to submit a review please approach the Reviews Editor with a brief outline of your topic. This can be done via our [feedback form](#).

Reviews should, in general, conform to the requirements for original research articles and be of interest to specialists and comprehensible to non-specialist students, university teachers, research workers and clinicians. They should be concise, with approximately 60 references and 2-6 figures or tables. Original summary diagrams and illustrations of proposed models (in colour where appropriate) are encouraged. Line drawings may be redrawn. Boxes can be used to separate detailed explanations and background information from the main part of the text.

Research articles

Research articles should be substantial bodies of work describing original research that provides insight into the

mechanisms of reproductive biology.

Manuscripts should be concise and clear. We recommend a maximum of 10 figures and 60 references.

NEW! Reproduction will be reverting to its traditional article format, with the Materials and Methods section following on from the Introduction and before the Results section. All manuscripts submitted from now onwards should be prepared in this format.

1. Title page, 2. Abstract (maximum 250 words), 3. Introduction, 4. Materials and Methods, 5. Results, 6. Discussion, 7. Declaration of interest, 8. Funding, 9. Acknowledgements, 10. References, 11. Figure legends, 12. Tables, 13. Figures.

Debates

Reproduction is launching an exciting new debate article type in order to keep our readers up to date with the latest controversies in reproductive biology.

Debates will take the format of a general introduction from the proposer and opposer, followed by a constructive critique of each others point of view and any concluding remarks. The debate will be published as a single article, providing readers with an excellent overview resource for controversial topics. We anticipate that these articles will be of high interest and they will be prioritised for promotion.

Debate articles are commissioned by the Reviews Editor and undergo peer review by experts in the field. If you would like to suggest a debate topic please approach the Reviews Editor with a brief outline. This can be done via our [feedback form](#).

Submission

[Submit online](#) using the ScholarOne Manuscripts system.

Papers must be written in clear, concise English. Where English is not the first language of the authors, the journal strongly recommends the use of an [English language editing service](#).

If accepted, your article will be included in the [Reproduction Advance Publication service](#). Please ensure that the details entered in ScholarOne Manuscripts match those in the manuscript itself, as the Reproduction Advance Publication is generated from ScholarOne Manuscripts. In particular, ensure that affiliations are included and that the order, spelling and middle initials of authors are entered as you want them to appear online, as the Reproduction Advance Publication will be indexed in PubMed until the final typeset version is published.

Please prepare the content of your article as described [below](#).

Include a covering letter containing the following:

- ▶ A statement that the work has not been and will not be submitted for publication elsewhere until the editorial board has decided whether to publish the article
- ▶ A clear and succinct explanation of how your research advances present knowledge of reproductive biology

Articles quoted as 'in press' that are not available online as part of the [Reproduction Advance Publication service](#) or a similar scheme must be provided as supplementary files for reviewing purposes.

Give the names of up to five reviewers with email addresses. One of these scientists may be asked to referee the article.

Authors should keep copies of everything submitted.

Charges to authors

Reproduction is committed to keeping costs to authors to a minimum. Consequently, there are:

- ▶ No submission fees
- ▶ No page charges
- ▶ Colour figures are free where the use of colour is necessary, such as photographs and composite images. Colour printing is costly to the journal and colour should not be used for bar/line/pie charts.

Charges would only be incurred if you are publishing [supplementary data](#) or making your article [Open Access](#).

Preparation of manuscripts

General

- ▶ Use double line spacing throughout (including reference list and figure legends).
- ▶ Number all pages, and number the lines continuously throughout the entire manuscript down the left-hand side of each page.
- ▶ When preparing a revised manuscript, please highlight the changes to your manuscript within the document by using the highlighter function or coloured text.
- ▶ Manuscripts can be written in either UK or US English. As a guideline, follow the Shorter Oxford

English Dictionary for UK English or Merriam–Webster’s New Collegiate Dictionary for US English.

Define all abbreviations when first mentioned.



For further advice on manuscript preparation see the [Guidelines published by the European Association of Science Editors](#).

Gene and protein nomenclature

Manuscripts must be prepared in accordance with approved gene nomenclature.

- ▶ In gene and protein symbols, substitute Greek letters with the corresponding roman letter, e.g. TGFBR2 not TGFβR2.
- ▶ Avoid hyphens unless they are part of the approved symbol, e.g. IGF1 not IGF-1.
- ▶ Use arabic rather than roman numerals, e.g. BMPR2 not BMPRII.

Follow species-specific formatting standards as follows:

Mice and rats

Gene symbols should be in italics with only the first letter capitalised. Protein designations should be the same as the gene symbols except that all letters should be capitalised and in roman (i.e. not italicised). For example:

- ▶ Gene/RNA/DNA: Sox2
- ▶ Protein: SOX2

Use symbols approved by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and the Rat Genome and Nomenclature Committee, which can be queried at the [MGI website](#).

Humans, non-human primates and domestic species

Gene symbols should be in italics with all letters capitalised; protein designations should be the same as the gene symbols but not italicised. For example:

- ▶ Gene/RNA/DNA: SOX2
- ▶ Protein: SOX2

Use symbols approved by the [HUGO Gene Nomenclature Committee \(HGNC\)](#).

Fish

Gene symbols should be in italics with all letters in lower case; protein designations should be the same as the gene symbols but not italicised and with the first letter capitalised. For example:

- ▶ Gene/RNA/DNA: sox2
- ▶ Protein: Sox2

Use symbols approved by the Zebrafish Nomenclature Committee (ZNC), which can be queried at the [ZFIN website](#).

Title page

Include a separate title page with:

- ▶ Title (maximum 85 characters). Titles should be as short as possible while still informing the reader about the article content and engaging their interest
- ▶ Authors’ names and full addresses. The place where the work was carried out should be listed first. Use superscript numbers after authors’ names to indicate their affiliations
- ▶ Corresponding author’s postal and email address
- ▶ Short title (maximum 46 characters, including spaces)

Abstract

The abstract should be a single paragraph of not more than 250 words, clearly stating the objective of the study or review, the methods used (where applicable), and summarizing results and conclusions.

Avoid abbreviations and references.

Introduction

The introduction should set the study in context by briefly reviewing relevant knowledge of the subject; follow this with a concise statement of the objectives of the study.

Materials and Methods

Provide sufficient information for other workers to repeat the study. If well-established methods are used give a reference to the technique and provide full details of any modifications.

- ▶ Include the source of chemicals, reagents and hormones and give the manufacturer’s name and location (town, country) in parentheses.
- ▶ Give the generic name, dose and route of administration for drugs.
- ▶ Specify the composition of buffers, solutions and culture media.
- ▶ Use SI symbols, give concentrations in mol/l and define the term % as w/v or v/v for all solutions. For international units use iu (U should be used for enzyme activity).
- ▶ Specify the type of equipment (microscopes/objective lenses, cameras, detectors) used to obtain images.
- ▶ Specify any image acquisition software used, and give a description of specialized techniques

surface and volume rendering.

Authors are encouraged to refer to the [MIQE guidelines](#) (Clinical Chemistry 55:611–622), and in particular the [checklist](#) within them, when preparing manuscripts detailing quantitative real-time PCR experiments.

Animals

Experiments with animals must be performed in accordance with UK legal requirements. Include a statement that investigations have been approved by the local ethical committee.

- ▶ Give the full binomial Latin names for all experimental animals other than common laboratory animals.
- ▶ State the breed or strain and source of animals, and give details of age, weight, sex and housing.
- ▶ Detail the procedures and anaesthetics used, including doses given.

Authors are encouraged to refer to the [ARRIVE guidelines](#), and in particular the checklist within them, when preparing manuscripts detailing animal experiments.

Statistical analysis

Give sufficient details of the experimental design and analysis so that the reader can assess their adequacy and validity for testing the hypotheses of interest.

In particular:

- ▶ Describe the numbers of experimental units used and the way in which they have been allocated to treatments.
- ▶ Justify the omission of any observations from the analysis.
- ▶ Describe methods of analysis precisely and state any necessary assumptions, as these may affect the conclusions that can be drawn from the experiment.

Your article may be sent to the Statistical Advisor for comments.

Declaration of interest, Funding and Acknowledgements

Declaration of interest

Actual or perceived conflicts of interest for all authors must be declared in full.

Please either (a) declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported; or (b) fully declare any financial or other potential conflict of interest.

Conflicts of interest include, but are not limited to:

- ▶ Employment and consultancies
- ▶ Grants, fees and honoraria
- ▶ Ownership of stock or shares
- ▶ Royalties
- ▶ Patents (pending and actual)
- ▶ Board membership

Funding

Please detail all of the sources of funding relevant to the research reported in the following format:

This work was supported by the Medical Research Council (grant numbers xxxx, yyyy); the Wellcome Trust (grant number xxxx); and Tommy's Baby charity (grant number xxxx).

Where research has not been funded please state the following:

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Acknowledgements

Please be as brief as possible.

References

All references cited in the text must be included in the reference list and vice versa. However, if a reference consists of only a web address do not include it in the reference list but cite it in the text, giving the date the page was accessed.

Unpublished work

Any unpublished work (personal communications, manuscripts in preparation and manuscripts submitted but not yet accepted for publication) must be referred to in the text and not listed in the references.

Give the full list of authors, including their initials, and the date. For example:

(A Stone, J Brown & M R Smith 2010, unpublished observations)

(J Brown 2011, personal communication)

Articles accepted for publication but not yet published may be listed as 'in press' in the reference list, using the

current year as the publication year. If an 'in press' article is included in the [Reproduction Advance Publication service](#) or a similar scheme, then the Digital Object Identifier (DOI) should be included; otherwise, provide a copy of the article as a supplementary file for reviewing purposes. [Details of how to cite such articles can be found here.](#)

In the text

Cite references in the text using the authors' names and publication year. Use et al. for articles with more than two authors. Where there are several citations, list them in chronological order.

In the reference list

List references in alphabetical order. Give articles by the same author in the order:

- i. Single author
- ii. Two authors alphabetically according to the name of the second author
- iii. Three or more authors chronologically, with a, b and c etc. for articles published in the same year, in the order in which they are cited in the text.

List a maximum of ten authors. Where there are more than ten authors, list the first ten and then use et al.

Reference in the following format:

Kelly RW, King AE & Critchley HOD 2001 Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 121 3–19.

Byskov AG & Hoyer PE 1994 Embryology of mammalian gonads and ducts. In *The Physiology of Reproduction*, edn 5, pp 75–86. Eds E Knobil and JD Neill. New York: Raven Press.

EndNote

An EndNote style for Reproduction is available. To download the style,

1. RIGHT-CLICK to select this link: [Reproduction EndNote style \(.zip file, 2.1 KB\).](#)
2. Choose 'Save Target As' or 'Save Link As' from the drop-down menu.
3. Save the file to your computer and unzip it to extract the .ens file.
4. Copy the .ens file into the 'Style' folder within the EndNote program folder (usually found on the computer hard (C:) drive). If you are using a shared copy of EndNote over a network, the network administrator may need to do this.

Tables

Tables should be concise. Tables too large for print publication should be submitted as supplementary data.

- ▶ Number tables in the order they are cited in the text.
- ▶ Include a title – a single sentence at the head of the table that includes the name of the organism studied.
- ▶ Use footnotes to provide any additional explanatory material, cross-referenced to the column entries.
- ▶ Give a short heading for each column.
- ▶ Do not use internal horizontal or vertical lines, colour or shading.
- ▶ Explain all abbreviations used in the table in the footnotes.

Figures

Colour figures are free where the use of colour is necessary, such as photographs and composite images. Colour printing is costly to the journal and colour should not be used for bar/line/pie charts.

Authors with particularly interesting and attractive images should consider submitting them to our cover art competition. [See below for more information.](#)

- ▶ Number figures in the order they are cited in the text.
- ▶ Include legends to all figures, giving the figure number, keys to any symbols used, the name of the organism studied, the names of any statistical tests used and the probability levels used for comparisons.
- ▶ Label figure sections as A, B etc in the top left-hand corner.
- ▶ Use Arial or a similar sans-serif font for text labels.
- ▶ Do not enclose figures in boxes.
- ▶ Indicate magnification by a scale bar in the bottom right-hand corner of the image and give the measurement in the legend.
- ▶ Use the preferred symbols of closed and open circles, squares and triangles. Ensure that symbols are large enough to be read clearly when the figure is reduced for publication.
- ▶ Use Courier or a similar non-proportional font for amino acid, DNA, RNA and PCR primer sequences and highlight sections of homology between sequences with grey shading.

File types and resolution

Reproduction is committed to publishing high quality figures.

EPS or TIFF files are preferred. Files should be exported in Illustrator compatible format. Avoid using PowerPoint or Word files for figures.

[Additional information regarding the submission of figures can be found here.](#)

Line images/graphs

- ▶ File types: EPS, TIFF, high-resolution PDF, AI (Adobe Illustrator)
- ▶ Resolution at final published size: 1200 dpi

Half-tone (greyscale) images

- ▶ File types: TIFF, high-resolution PDF, JPEG
- ▶ Resolution at final published size: 600 dpi

Colour images

Colour figures and illustrations are printed without charge to the author at the discretion of the editorial office and a member of the editorial board.

- ▶ File types: TIFF, high-resolution PDF, JPEG. EPS or AI files can be used for graphical data and illustrations that don't include photographs
- ▶ Resolution at final published size: 300 dpi
- ▶ Colour format: CMYK (not RGB)

Image acquisition and manipulation

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The groupings of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g. using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend. Adjustments should be applied to the entire image. Threshold manipulation, expansion or contraction of signal ranges and the altering of high signals should be avoided.

This policy is adopted from [The Journal of Cell Biology](#).

Supplementary data

Supplementary data too large for print publication or exceeding the bounds of the manuscript may be submitted for online publication.

Supplementary data files intended for online publication should be submitted online via ScholarOne Manuscripts as 'Supplemental File for Review', and referred to as supplementary data in the text:

(Supplementary Table 1)

(Supplementary Figures 1 and 2)

Supplementary information will be reviewed as part of the manuscript, evaluated for its importance and relevance and, if accepted, will be referenced in the text of the article, directing readers to the website.

There is a charge to the author of 100 GBP for the first file and 20 GBP for each subsequent file. Each figure, table, movie, etc. will be treated as a separate file.

Reprints

A free PDF will be emailed to all the authors of an article. Please email bioscireprints@cadmus.com if you wish to purchase reprints of your article.

Cover art competition

Readers are invited to submit reproductive biology images for consideration as the cover of *Reproduction*.

Figures must be of high quality and resolution of at least 300 dpi at the final published size (280 mm × 210 mm).

Winners will be selected by the Editor-in-Chief and awarded a prize of 100 GBP. Winning images will be used on the cover of the journal for three issues, in print and online, and may be used in promotional material. Images not selected for use may still be used on the Society for Reproduction and Fertility and BioScientifica websites for promotional purposes.

By submitting an image you warrant that you own the copyright and agree to the use of the image as described above.

Images should be accompanied by a short caption of 25–30 words explaining what the image depicts and who should be acknowledged for its production. For further information on how to submit an image please [contact the editorial office](#).

Article promotion

Where appropriate, published articles are promoted to scientists and clinicians from all over the world to ensure maximum reach and visibility of our authors' work.

How we may promote your work

- ▶ Press releases for papers of high interest and broad appeal.
- ▶ Communications to members of the owning society, the Society for Reproduction and Fertility

(SRF), via multiple media.

- ▶ Bioscientifica journals are promoted at c.40 conferences a year and your article may be picked to feature on our Themed Collection handouts.
- ▶ Bimonthly email newsletters, including topic collections, sent to authors, readers, editors, reviewers and anybody else with an interest in the journal.
- ▶ Social Media coverage by the SRF on their facebook and twitter pages.

Tips for promoting your own work

Did you know that a Tweeted article is 11 times more likely to be cited up to 29 months after publication than an un-Tweeted article (source: [Eysenbach 2011](#))?

Get the most out of your published article by considering the following:

- ▶ You will receive a link to your published article which you can send to colleagues who may be interested in your line of research.
- ▶ Use Kudos to maximize the impact of your article.
- ▶ Add your article to the list of publications on your institution's webpages.
- ▶ Use of social media: tweet your article and mention @SRF_Repro for a retweet.
- ▶ Link to the paper in work-related blogs and professional websites.

Kudos

Bioscientifica is working with [Kudos](#) to help our authors maximize the impact of their published work.

Kudos provides a free set of tools to help you explain your work in new ways and share it both within your networks, and more widely. You can measure the results of these actions and track the resulting increase in downloads, readership and, ultimately, citations.

Authors using [Kudos](#) sharing tools receive on average 19% more downloads for their articles than those who don't.

[Kudos](#) is free to use and only takes a few minutes of your time.

Article level metrics

Article level metrics are available for articles published in Reproduction. This feature provides traditional usage data (number of article downloads/views) as well as [Altmetric](#) data for individual articles published in the journal. Altmetric provide non-traditional data by tracking a selection of online indicators (both scholarly and non-scholarly) to give a measurement of digital impact and reach. This information is used to generate an article's Altmetric score.

These article level metrics allow authors to monitor the impact of their research in academia and beyond.

[Back to top](#)
