



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba - Faculdade de Odontologia

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**LARISSA VICTORINO SAMPAIO**

**EFEITOS DA DOSE SUPRA FISIOLÓGICA DE CIPIONATO  
DE TESTOSTERONA NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA  
SALIVA, FUNÇÃO E ESTADO REDOX DAS GLÂNDULAS  
PARÓTIDA E SUBMANDIBULAR DE RATOS WISTAR**

**Araçatuba - SP**  
**2024**

**LARISSA VICTORINO SAMPAIO**

**EFEITOS DA DOSE SUPRA FISIOLÓGICA DE CIPIONATO  
DE TESTOSTERONA NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA  
SALIVA, FUNÇÃO E ESTADO REDOX DAS GLÂNDULAS  
PARÓTIDA E SUBMANDIBULAR DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto

**Araçatuba - SP  
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S192e Sampaio, Larissa Victorino.  
Efeitos da dose supra fisiológica de cipionato de testosterona na composição bioquímica da saliva, função e estado redox das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar / Larissa Victorino Sampaio. - Araçatuba, 2024  
69 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba  
Orientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto

1. Congêneres da testosterona 2. Glândulas salivares  
3. Saliva 4. Estresse oxidativo I. T.

CDD 612

# **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Larissa Victorino Sampaio**

**EFEITOS DA DOSE SUPRA FISIOLÓGICA DE CIPIONATO DE TESTOSTERONA  
NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA SALIVA, FUNÇÃO E ESTADO REDOX DAS  
GLÂNDULAS PARÓTIDA E SUBMANDIBULAR DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto

**Aprovado em:** 02/10/2024

## **Banca Examinadora**

Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP

Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMVA/UNESP

Prof. Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA/UNESP

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 25. 03. 1997, Luiziânia – SP.

**Filiação:** Fátima Theodora Victorino Sampaio

Umberto Leite Sampaio

**2018/2021:** Curso de Graduação em Enfermagem – Universidade Paulista – UNIP – Araçatuba – SP.

**2022/2024:** Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais Fátima e Umberto, os grandes amores da minha vida. Sem eles todas minhas conquistas não teriam sido possíveis. A mulher forte que me tornei é reflexo de tudo que me ensinaram. Amo vocês infinitamente!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as bênçãos concedidas e força diante de tantos momentos difíceis que enfrentei.

A minha família, em especial meus pais Fátima e Umberto, por todo apoio e suporte oferecidos durante toda minha vida e durante o mestrado, sem eles eu não teria conseguido chegar até o final. Ao meu irmão Matheus e minha cunhada Simone pelo apoio e pela compreensão nos momentos difíceis.

A todos meus amigos de caminhada Arieli Raymundo Vazão, Gabriela Alice Fiais, Renan José Barzotti e Rayara Nogueira de Freitas, por todo conhecimento compartilhado, pelo apoio emocional diante de tantos momentos desafiadores. Minha eterna gratidão e admiração por vocês!

Agradecimento especial ao meu grande amigo Renan José Barzotti, por compartilhar comigo tantos momentos felizes e me dar apoio para que eu não desistisse. Você fez o processo se tornar melhor amigo, lhe admiro muito!!!

Aos alunos de iniciação científica Heloísa Rodrigues dos Santos Landim, Lívia Claudino, Pedro Penati Pimpinato, José Vitor Furuya de Lima e Lívia da Silva Prado Torres, por compartilharem comigo tantos conhecimentos, e por se empenharem na execução deste trabalho! Sem vocês eu não teria feito nada!

Aos amigos que se juntaram ao Laboratório de Bioquímica da Saliva durante esta jornada, Guilherme Eduardo Rocha Silva, Maria Clara Pacce Bispo, Isabel Dourado de Oliveira, Rafaela Yumi Gregório Fuzishima e Ana Clara Emilio Padovezi, foi muito bom compartilhar tantos momentos com vocês.

A professora Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pela colaboração e por todos os ensinamentos passados durante esta jornada. Tenha certeza de que é um exemplo de mulher e profissional para mim!

A professora Dra. Rita Cassia Menegatti Dornelles pela parceria durante a execução deste trabalho!

A professora Dra. Giovana Rampazzo Teixeira, minha parecerista e a doutoranda Alice dos Santos Cruz Veras, pela parceria nas análises de histologia e imuno-histoquímica que fizeram esse trabalho ficar ainda mais lindo!

Ao Dr. Walid D. Fakhouri, professor na School of Dentistry - University of Texas Health Science Center at Houston, pelo auxílio prestado na escrita e correção do artigo científico.

Ao Dr. Rafael Rodrigues Lima, professor no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pelo auxílio na escrita e correção do artigo científico.

Aos professores Mariza Akemi Matsumoto e Paulo César Ciarlini pelo aceite para participar da minha banca de defesa de dissertação, admiro como pesquisadores!

A todos os colegas de departamento, obrigada pelas trocas de experiências durante todo esse período!

Ao meu orientador, Dr. Antonio Hernandes Chaves Neto, um exemplo de ser humano, que sempre me incentivou, orientou e ensinou de forma brilhante. Toda a cobrança e rigidez me fizeram evoluir como aluna, profissional e mulher. Devo todas as minhas conquistas durante esse tempo a você. Admiro como ser humano e profissional!

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa ofertada. O financiamento foi de extrema importância para que eu pudesse realizar todas minhas conquistas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2022/11245-3.

*“Aquilo que não me mata, me fortalece”.*

**Friedrich Nietzsche, 1908**

## RESUMO

SAMPAIO, L. V. **Efeitos da dose supra fisiológica de cipionato de testosterona na composição bioquímica da saliva, função e estado redox das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

O uso abusivo de esteroides anabolizantes androgênicos tornou-se um sério problema de saúde em todo o mundo, mas seus efeitos na saúde bucal ainda são pouco compreendidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dose supra fisiológica de cipionato de testosterona (CT) nos parâmetros bioquímicos salivares, histomorfometria, imunohistoquímica e estado redox das glândulas parótida e submandibular. Vinte ratos Wistar, de 12 semanas de idade, foram divididos em dois grupos (n=10/grupo): grupo controle e grupo CT, que recebeu uma dose de 20 mg/kg (Deposteron®, EMS Sigma Pharma LTDA, Brasil), uma vez por semana, durante 6 semanas. Após o tratamento, a saliva e as glândulas foram coletadas. A administração de CT aumentou as concentrações de testosterona plasmática e salivar. Embora o CT não tenha alterado o fluxo salivar, o pH e a capacidade tamponante, o tratamento aumentou a secreção salivar de proteína total e reduziu amilase, cálcio, fosfato e potássio. O CT reduziu a área do tecido conjuntivo na glândula parótida e a área acinar da glândula submandibular, ao mesmo tempo que aumentou a área dos túbulos convolutos granulares na glândula submandibular. O antígeno nuclear de células em proliferação foi maior nas células acinares das glândulas submandibulares do grupo CT. Além disso, o CT aumentou as concentrações de capacidade oxidante total e do dano aos lipídeos em ambas as glândulas salivares, enquanto a atividade antioxidante total e o ácido úrico foram menores na glândula submandibular, e a glutatona reduzida foi maior em ambas as glândulas. As atividades de superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase foram maiores na glândula parótida, enquanto apenas a atividade da glutatona peroxidase foi menor na glândula submandibular do grupo CT. Em conclusão, o abuso de CT pode ser um fator potencial para a disfunção das glândulas parótida e submandibular, tornando-se um fator de risco para a saúde bucal e sistêmica dos usuários.

**Palavras-chave:** congêneres da testosterona; glândulas salivares; saliva; cipionato de testosterona; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

SAMPAIO, L. V. **Effects of supraphysiological doses of testosterone cypionate on the biochemical composition of saliva, function, and redox state of the parotid and submandibular glands of Wistar rats.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

The abusive use of anabolic androgenic steroids has become a serious health problem worldwide, but its effects on oral health are still poorly understood. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of a supraphysiological dose of testosterone cypionate (TC) on salivary biochemical, histomorphology, immunohistochemistry, and redox state parameters of parotid and submandibular glands. Twenty male Wistar rats, 12 weeks old, were divided into two groups (n=10/group): a control group and TC group, which received a dose of 20 mg/kg, once a week, for 6 weeks. Post treatment, the saliva and glands were collected. A supraphysiological dose of TC increased plasma and salivary testosterone concentrations. Although TC did not alter salivary flow, pH, and buffering capacity, the treatment increased the salivary secretion of total protein and reduced amylase, calcium, phosphate, and potassium. TC reduced the connective tissue area in the parotid gland and acinar area of the submandibular gland, while increasing the granular convoluted tubule area in the submandibular gland. Proliferating cell nuclear antigen was higher in the acinar cells of the submandibular glands from the TC group. Moreover, TC increased concentrations of total oxidant capacity and damaged lipids in both salivary glands, while total antioxidant activity and uric acid were lower in the submandibular gland, and reduced glutathione was higher in both glands. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities were higher in the parotid gland, while only glutathione peroxidase activity was lower in the submandibular gland of the TC group. In conclusion, TC abuse may be a potential factor for dysfunction of the parotid and submandibular glands, becoming a risk factor for the oral and systemic health of users.

**Keywords:** salivary glands; saliva; testosterone cypionate; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hormônios na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	15
Figura 2 - Sistema de defesa antioxidante enzimático .....	17
Figura 3 - Delineamento experimental esquemático .....	22
Figura 4 - Coleta da saliva estimulada .....	24
Figura 5 - Eutanásia e coleta de tecidos .....	25
Figura 6 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nas concentrações de testosterona plasmática e livre salivar de ratos Wistar .....	32
Figura 7 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares de ratos Wistar .....	37
Figura 8 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na imuno marcação para PCNA das glândulas parótida e submandibular .....	38
Figura 9 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores do dano oxidativo .....	39
Figura 10 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores da capacidade antioxidante não - enzimática .....	40
Figura 11 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores da defesa antioxidante enzimática .....	41

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no peso corpóreo inicial e final, consumo de comida e água, coeficiente de eficiência alimentar, atividade de AST e ALT, peso absoluto e relativo da próstata, glândulas e proteína total tecidual.....	34
Tabela 2 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tampão, proteína total, amilase, cálcio, fosfato, potássio, sódio e cloreto .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
Cu <sup>+</sup>	Cobre
DNPH	2,4-nitrofenilidrazina
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EAA	Esteróide anabolizante androgênico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>2+</sup>	Ferro ferroso
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H&E	Hematoxilina & Eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidada
NADPH oxidase	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase
NO <sup>·</sup>	Radical óxido nítrico
<sup>·</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical ânion superóxido
<sup>·</sup> OH	Radical hidroxila
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
CT	Cipionato de testosterona
tc	Tecido conjuntivo
TCGs	Túbulos convolutos granulares
U	Unidade de atividade enzimática

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Tratamento com alta dose de cipionato de testosterona	21
3.3 Controle do peso corporal, consumo de água e ingestão de comida	22
3.4 Coleta da saliva, fluxo salivar, pH e capacidade tamponante	23
3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido e sangue	24
3.6 Parâmetros bioquímicos	25
3.7 Análise da concentração de testosterona total plasmática	25
3.8 Análise da função hepática	26
3.9 Análises bioquímicas salivares	26
3.9.1 Análise da testosterona salivar	27
3.10 Análise histomorfométrica	27
3.11 Análise imuno-histoquímica de PCNA	27
3.12 Análise bioquímica das glândulas salivares	28
3.12.1 Preparação dos homogenatos das glândulas salivares	28
3.12.2 Análises do dano oxidativo	28
3.12.3 Análises da defesa antioxidante não enzimática	29
3.12.4 Análises da defesa antioxidante enzimática	29
4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Concentração de testosterona plasmática e salivar	32
5.2 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no peso corpóreo inicial e final, consumo de água, comida, coeficiente de eficiência alimentar, atividade de AST e ALT, peso e index da próstata, glândulas parótidas e submandibulares e proteína total das glândulas salivares	33
5.3 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros bioquímicos salivares	35

5.4 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares	36
5.5 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na imuno marcação para PCNA38	
5.6 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no dano oxidativo das glândulas salivares	39
5.7 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na defesa antioxidante não-enzimática das glândulas salivares	40
5.8 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na defesa antioxidante enzimática das glândulas salivares	41
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	60

# 1 INTRODUÇÃO

Os hormônios esteroides são substâncias produzidas em sua maioria pelo córtex das glândulas suprarrenais e pelas gônadas (testículo) no qual podem ser definidos como hormônios esteroides androgênicos ou anabolizantes. A função androgênica desse grupo se relaciona com o potencial do hormônio desenvolver o aparelho reprodutor masculino e conferir características secundárias, como produção e maturação dos espermatozoides, crescimento durante a puberdade, desenvolvimento de pelos e espessamento das cordas vocais, já a função anabolizante remete a capacidade de estimular a fixação de nitrogênio nos tecidos, promovendo aumento da síntese proteica (Esposito *et al.*, 2023; Karbasi *et al.*, 2018; Niedfeldt, 2018; Sadowska-Krepa *et al.*, 2017). Os hormônios esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs), como são conhecidos, fazem parte de uma classe de substâncias naturais ou sintéticas formados a partir da testosterona ou de seus derivados, possuindo diversas finalidades terapêuticas, dentre elas, a mais importante a reposição hormonal em homens com hipogonadismo (Joksimović *et al.*, 2017; Luther *et al.*, 2024; Roman *et al.*, 2018). Em casos de falência na produção de testosterona, a terapia de reposição é indicada, sendo os esteroides como decanoato de testosterona, cipionato de testosterona e undecilato de testosterona os mais indicados no Brasil (ANVISA, 2016).

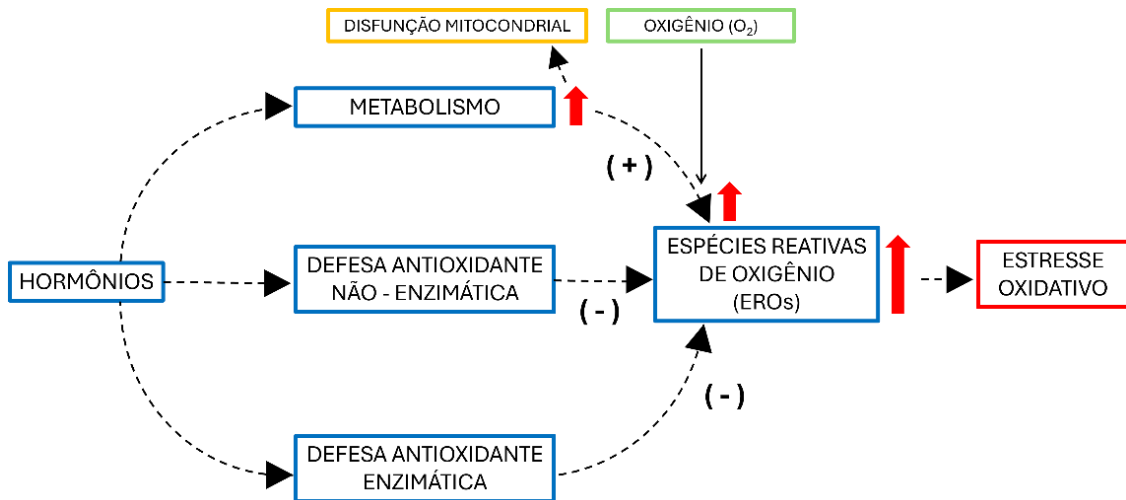
Assim como toda medicação, os EAA também possuem efeitos colaterais, especialmente quando o uso é abusivo, não terapêutico e sem a orientação de um profissional, com a finalidade de aumentar desempenho esportivo, muitos atletas, fisiculturistas e usuários de academias, utilizam essas drogas inconscientes dos seus efeitos deletérios, que provocam a curto prazo, em homens atrofia testicular, acne, retenção hídrica, estrias, perda de cabelo e agressividade, e nas mulheres hipertrofia do clitóris, alterações menstruais e surgimento de pelos (Abrahin; Souza; Santos, 2014; Karbasi *et al.*, 2018). A longo prazo hipertrofia cardíaca (Wadthaisong *et al.*, 2019), dano hepático (Sadowska-Krepa *et al.*, 2017) e bucais são descritas (Torres-Bugarin *et al.*, 2007).

Os países do Oriente Médio têm a maior prevalência mundial no uso de EAA, com 21,7%, seguidos por América do Sul com 4,8%, Europa com 3,8% e América do Norte com 3%, sendo os usuários de academia e atletas a principal população usuária dessas substâncias (Sagoe *et al.*, 2014). No Brasil dados mostram que o uso varia entre 4,76% (Freitas *et al.*, 2019), 11,1% (Silva *et al.*, 2007), 19% (Silva; Moreau, 2003), 20,6% (Nogueira *et al.*, 2014), 31,6% (Abrahin *et al.*, 2013), 46% (Oliveira; Cavalcante Neto, 2018) até 46,3% (Neves *et al.*, 2021)

de acordo com as características das amostras (professores de educação física, atletas amadores, praticantes de musculação, etc) e a região do país. A prevalência é maior entre homens (Freitas *et al.*, 2019; Neves *et al.*, 2021; Nogueira *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2007). Todavia o uso de EAA pode ser ainda maior, pois os usuários demonstram resistência na participação das pesquisas, uma vez que muitos adquirem os EAAs de forma ilícita e sem a prescrição médica (Abrahin *et al.*, 2013). Por sua vez, a falta de acompanhamento médico e de exames prévios, representa um grande risco para o surgimento de efeitos adversos mais severos nos usuários (Neves *et al.*, 2021). O cipionato de testosterona é citado como uma das opções de esteroides anabólicos androgênicos na maioria dos estudos (Iriart; Chaves; Orleans, 2009; Silva; Moreau, 2003; Silva *et al.*, 2007).

A testosterona é um hormônio que aumenta a taxa metabólica celular, promovendo maior consumo de oxigênio pelos tecidos e esse gasto energético pode acarretar maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando ao dano oxidativo, assim como demonstrado na figura 1 (Chainy; Sahoo, 2020; Puttabyatappa *et al.*, 2013). Devido essa capacidade em promover dano oxidativo, muitos estudos têm sido realizados para avaliar qual o impacto que o consumo de altas doses de EAA podem ocasionar nos tecidos. Por exemplo, a hepatotoxicidade induzida por altas doses de enantato de testosterona em ratos foi também acompanhada pelo aumento do dano oxidativo aos lipídeos (TBARS) (Sadowska-Krepa *et al.*, 2017). Em hipocampo de ratos, a administração de enantato de testosterona aumentou o índice de peroxidação lipídica (TBARS) e reduziu a atividade da superóxido dismutase (SOD) (Joksimović *et al.*, 2017). Por sua vez, o uso de cipionato de testosterona combinado com dieta rica em gordura também demonstrou redução de catalase (CAT), SOD e glutathione S-transferase (GST) em tecido hepático de camundongos (Santos *et al.*, 2018). No tecido cardíaco a administração, dose dependente, de testosterona sintética também demonstrou elevação nos níveis de dano aos lipídeos (TBARS) e das enzimas SOD e glutathione peroxidase (GPx), o que demonstra o efeito cardiotoxico do EAA em ratos (Emer *et al.*, 2016).

**Figura 1 - Hormônios na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)**



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Chainy e Sahoo (2020)

Os hormônios possuem a capacidade de aumentar a taxa do metabolismo basal, levando a disfunção mitocondrial, o que gera maior espécies reativas de oxigênio e consequentemente o estresse oxidativo.

A cavidade bucal é uma das principais portas de entrada a patógenos no corpo humano, necessitando dessa forma de um mecanismo de defesa eficiente para evitar possíveis infecções, sendo de grande importância uma saúde bucal de qualidade (Campos *et al.*, 2005; Cypriano *et al.*, 2021; Mahajan *et al.*, 2022). É revestida por uma membrana mucosa e constantemente umedecida pela saliva, que é produzida por ácinos encontrados nas glândulas salivares e secretada por um sistema de ductos, como os ductos intercalados, estriados, excretores e excretores principais, que são fortemente influenciados pelo sistema nervoso simpático e parassimpático (Amano *et al.*, 2012).

A saliva é uma mistura de água, proteínas e eletrólitos como Sódio (Na<sup>+</sup>), Potássio (K<sup>+</sup>), Cálcio (Ca<sup>2+</sup>), Magnésio (Mg<sup>2+</sup>), Cloreto (Cl<sup>-</sup>), Fosfato de hidrogênio (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e Bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), possuindo um potente mecanismo de defesa. Cerca de 90% de toda produção é realizada pelas glândulas maiores sublingual (SL), submandibular (SM) e parótida (PA) e os outros 10% por glândulas menores dispersas pela cavidade bucal (Bhattarai; Kim; Chae, 2018; Pedersen *et al.*, 2018). Além de ser responsável pela hidratação, lubrificação, digestão e formação do bolo alimentar, possui componentes que atuam na imunidade inata e adaptativa, como as imunoglobulinas e enzimas responsáveis pela proteção. Doenças como a Síndrome de Sjögren, artrite reumatoide, cálculos e tumores glandulares, infecções, envelhecimento, radioterapia e o uso de algumas medicações podem levar a disfunção de secreção salivar, ocasionando xerostomia (Burlage *et al.*, 2001; Fox, 1998; Guggenheimer; Moore, 2003),

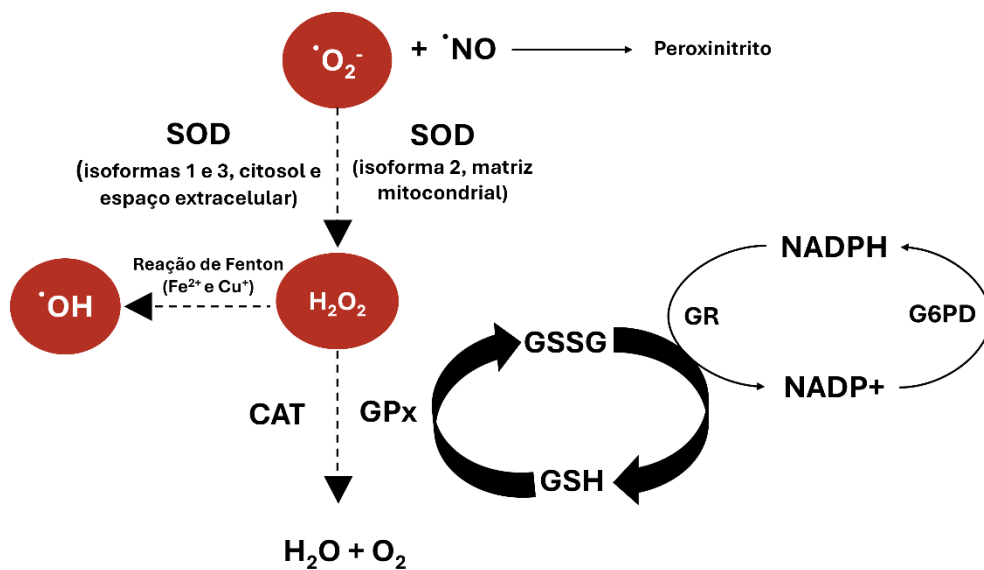
proporcionando assim um desequilíbrio do sistema de defesa bucal, deixando desse modo a cavidade bucal mais suscetível ao supercrescimento bacteriano, propiciando o surgimento de cáries e doença periodontal, por exemplo (Featherstone, 2000; Mahajan *et al.*, 2022). Apesar disso, até o momento não foi descrito sobre as condições de saúde bucal de usuários de EAA, portanto, se faz de extrema relevância a condução de pesquisas afim de se avaliar a existência de efeitos deletérios na saúde bucal, como também na função das glândulas salivares.

O tecido das glândulas salivares é muito similar entre roedores e humanos, possuindo em ambos a capacidade de secretar fatores de crescimento e androgênios, promovendo a captura e secreção desses andrógenos na cavidade bucal, apresentando dessa forma dimorfismo sexual, em especial pela ação da testosterona (Amano *et al.*, 2012). Em ratos esse dimorfismo se dá nos túbulos convolutos granulares (TCGs) e nos humanos no ducto estriado (Proctor, 2016), e por essa razão, a glândula se torna dependente do hormônio. Estudos experimentais com ratos orquiectomizados mostram a ocorrência de alterações morfológicas como uma redução dos ácinos, ductos, expressão dos receptores de androgênio, além de promover aumento do tecido conjuntivo das glândulas parótidas (Jezek; Banek; Banek, 1996; Li *et al.*, 2005), enquanto nas glândulas submandibulares de roedores, a orquiectomia causa extensa involução das células dos TCGs devido à conversão do fenótipo em células do ducto estriado (Adthapanyawanich *et al.*, 2015). Em contrapartida, o tratamento com implantes subcutâneos de testosterona em ratos eugonadais mostraram que a exposição a níveis supra fisiológicos de testosterona pode resultar em aumento do peso e da área dos túbulos convolutos granulares nas glândulas submandibulares (Valente-Santos *et al.*, 2023).

O sistema de defesa das glândulas salivares, pode ser divididos em dois complexos, o enzimático que inclui enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, GPx e tiorredoxina redutase, que atuam especialmente em mecanismos de neutralização dos radicais livres para então combater o estresse oxidativo como demonstrado na figura 2; além do complexo não enzimático, composto pelas vitaminas A, C, carotenóides, glutathiona reduzida (GSH), ácido úrico (AU) e albumina, sendo que a ocorrência de um desequilíbrio nesses complexos é possível observar disfunções (Lasisi *et al.*, 2021). Envelhecimento, distúrbios endócrinos, doenças autoimunes e alterações iatrogênicas devido ao uso de medicamentos e radioterapia podem causar ou contribuir para a disfunção das glândulas salivares. Modelos animais mostraram que distúrbios nos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos têm sido implicados como mecanismos que levam à disfunção da glândula salivar. Estudos feitos com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina mostraram que o distúrbio do estado redox é caracterizado por

aumento do dano oxidativo aos lipídeos e maior atividade da SOD, CAT e GPx (Ibuki; Simões; Nogueira, 2010; Nogueira *et al.*, 2005). O desequilíbrio do estado redox nas glândulas parótidas em ratos que desenvolveram resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gordura foi associado com uma redução na atividade da peroxidase e um aumento na SOD, CAT e AU (Zalewska *et al.*, 2014). A redução na secreção salivar e na atividade da amilase salivar em camundongos após a radiação foi associada a um aumento no dano oxidativo aos lipídeos e menor atividade da SOD nas glândulas submandibulares (Xu *et al.*, 2013). Por sua vez, o tratamento crônico com etanol aumentou o dano lipídico, SOD e CAT na glândula parótida de ratos (Campos *et al.*, 2005). Por outro lado, o mecanismo de toxicidade do metronidazol nas glândulas salivares indica atenuação da barreira protetora antioxidante devido à diminuição da CAT, SOD, GPx e capacidade antioxidante total (Onopiuk *et al.*, 2018). Porém até o momento, pouco se sabe sobre os efeitos com o uso de altas dosagens de cipionato de testosterona no estado redox das glândulas salivares.

**Figura 2 - Sistema de defesa antioxidante enzimático**



Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Chainy e Sahoo (2020)

Sistema de defesa antioxidante enzimático.

Portanto, o objetivo do estudo atual foi avaliar de forma abrangente os efeitos de dose supra fisiológica de cipionato de testosterona (CT), um derivado sintético de testosterona na forma de um éster de 17 (beta)-ciclopentilpropionato solúvel em óleo, sobre parâmetros bioquímicos salivares, histomorfométricos, imuno-histoquímicos e do estado redox das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar. Compreender esses efeitos é crucial para

elucidar os danos potenciais que a administração excessiva de CT, uma formulação representativa de EAA, pode causar ao sistema glandular oral e, conseqüentemente, à saúde oral e sistêmica dos organismos afetados. A hipótese é que a dose supra fisiológica de CT promove disfunção nas glândulas parótida e submandibular.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito do tratamento com dose supra fisiológica de cipionato de testosterona na composição bioquímica da saliva, na histomorfometria, imuno-histoquímica e estado redox das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Para responder a hipótese e efetivar nosso objetivo geral, foram propostas as seguintes estratégias:

- Avaliar o efeito da administração com dose supra fisiológica de cipionato de testosterona na massa corpórea, ingestão de comida e água, coeficiente de eficiência alimentar, peso corporal, peso absoluto e relativo glandular e concentração de proteína total no homogenato das glândulas parótida e submandibular;
- Avaliar dano hepático pela dosagem sérica de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT);
- Avaliar as concentrações de testosterona plasmática total e testosterona livre salivar;
- Avaliar o fluxo salivar, capacidade tamponante, pH, atividade da amilase, além das concentrações de proteína total, cálcio, fósforo, potássio, cloreto e sódio na saliva, por meio da indução da salivação com pilocarpina nos animais sob anestesia geral;
- Avaliar os aspectos histomorfométricos das glândulas parótida e submandibular por meio da coloração com hematoxilina & eosina (H&E);
- Avaliar o marcador de proliferação celular (PCNA) por meio da análise de imuno-histoquímica;
- Avaliar o dano oxidativo quantificando a capacidade oxidante total, as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a proteína carbonilada no homogenato das glândulas parótida e submandibular;

- Avaliar a defesa antioxidante não enzimática por meio das dosagens da capacidade antioxidante total não-enzimática, ácido úrico e GSH no homogenato das glândulas parótida e submandibular;
- Avaliar a defesa antioxidante enzimática por meio da análise da atividade enzimática das enzimas SOD, CAT e GPx no homogenato das glândulas parótida e submandibular.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 300 e 400 gramas, 3 meses de idade, provenientes do biotério local. Os animais foram mantidos em caixas (2 por caixa) em ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C, ciclo de claro/escuro de 12 horas e umidade relativa do ar entre  $55 \pm 5\%$ . Água e ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil) foram disponibilizadas *ad libitum*, durante todo o período de tratamento e durante a adaptação ao Biotério do Departamento de Ciências Básicas – Prédio 31 (7 dias). O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA-UNESP (Protocolo de aprovação n°0373-2022).

### 3.2 Tratamento com alta dose de cipionato de testosterona

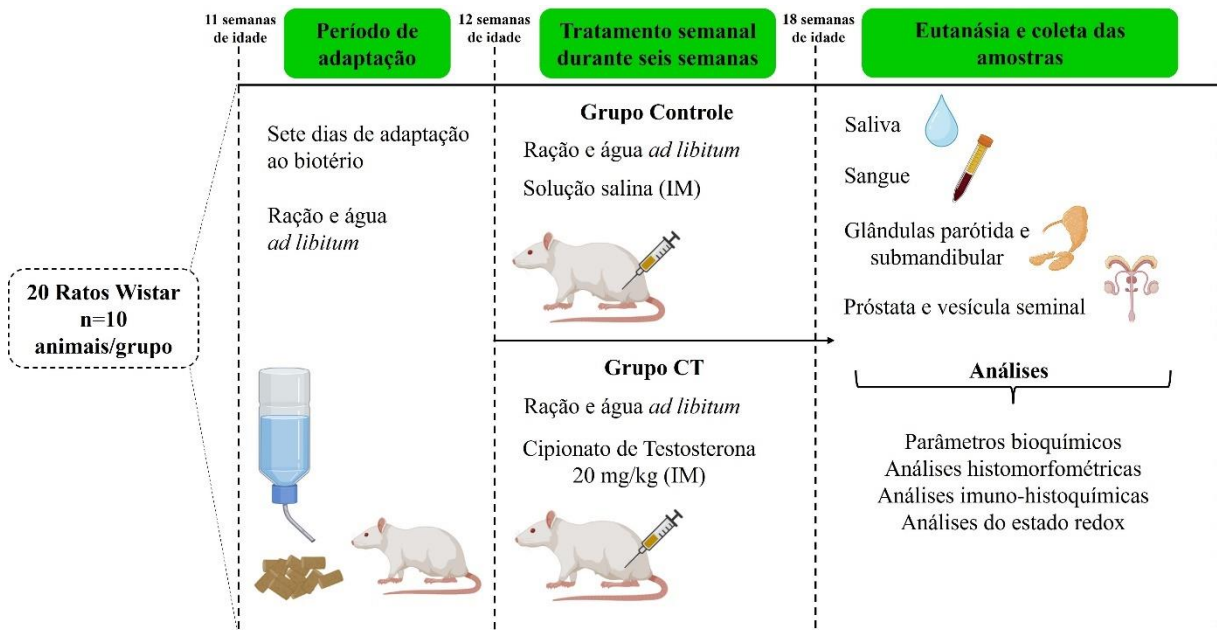
Após o período de aclimatação, os animais foram estratificados pela massa corpórea e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em dois grupos da seguinte forma (n = 10 ratos/grupo): grupo controle e grupo cipionato de testosterona (CT). O grupo CT recebeu 20 mg/kg de Deposteron® (EMS Sigma Pharma LTDA, Brasil) por meio de injeções intramusculares no músculo da porção posterior das patas traseiras (músculo quadríceps), semanalmente, durante 6 semanas, conforme mostrado na figura 3. Para o cálculo da dose foi utilizado a fórmula para dose translacional baseada na superfície de área corpórea ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) (Reagan-Shaw; Nihal; Ahmad, 2008) a partir da dose de cipionato de testosterona usada ilegalmente em atletas (Bi *et al.*, 2018).

Além disso, o protocolo terapêutico demonstrou efeitos associados com o aumento do dano oxidativo no hipocampo (Joksimović *et al.*, 2017), além de alterações comportamentais em ratos (Selakovic *et al.*, 2016, 2019). O local da injeção foi alterado de forma intermitente para minimizar o desconforto. O grupo controle recebeu doses de solução salina, a fim de promover a mesma situação de estresse do grupo CT.

O tamanho da amostra foi determinado usando o OpenEpi ([http://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)), com base na concentração de proteína total salivar obtida a partir de um estudo piloto. De acordo com o cálculo de poder estatístico, cinco animais em cada grupo eram suficientes para detectar uma diferença estatisticamente

significativa de 0,2 g/L na quantidade total de proteína salivar entre os grupos controle e CT, com um poder de 80% e um nível de significância de 5%. Para compensar possíveis mortes de animais durante a anestesia e a coleta de saliva, cinco animais adicionais foram incluídos em cada grupo, resultando em um total de 10 ratos por grupo e uma amostra final de 20 animais.

**Figura 3 - Delineamento experimental esquemático**



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os animais foram submetidos a um período de ambientação no biotério local do departamento de ciências básicas. Na 12ª semana de vida dos animais, foi iniciado o tratamento semanal, o grupo controle recebeu solução salina e o grupo CT ciproionato de testosterona 20 mg/kg IM, durante 6 semanas. Uma semana após o término do tratamento, os animais foram anestesiados, eutanasiados e todo material biológico coletado para as análises.

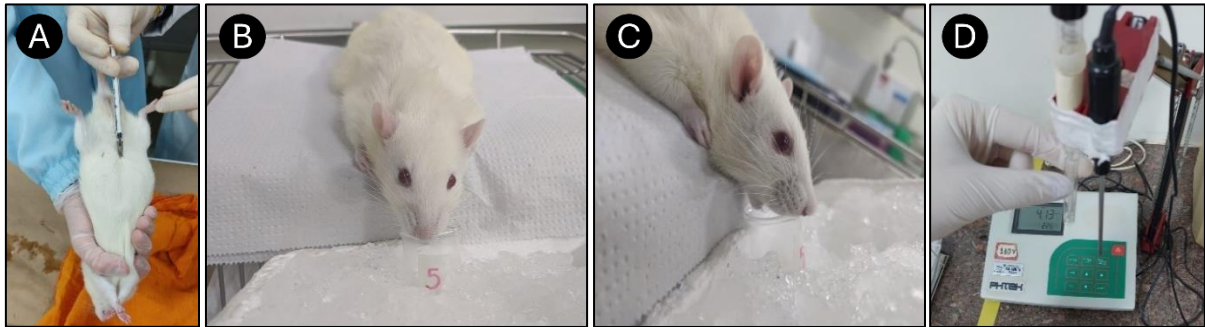
### 3.3 Controle do peso corporal, consumo de água e ingestão de comida

Os animais foram pesados semanalmente para o ajuste da dose de CT. O consumo de ração e água foi monitorado duas vezes por semana no mesmo horário do dia, até que os animais fossem eutanasiados. A quantidade de ração consumida foi expressa como o consumo total médio por animal por semana e o consumo de água foi expresso como o consumo total médio por caixa por semana. A eficiência alimentar foi avaliada através do Coeficiente de Eficiência Alimentar ( $CEA = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{quantidade total de alimento ingerida em gramas}}$ ), que representa a relação entre o ganho de peso e a quantidade de alimento ingerida (Diniz *et al.*, 2005).

### 3.4 Coleta da saliva, fluxo salivar, pH e capacidade tamponante

Uma semana após o último tratamento, os animais foram pesados e anestesiados com cetamina (50 mg/kg, i.m. - Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e xilazina (5 mg/kg, i.m. - Coopers, Brasil, Ltda.). Após a anestesia, 10 mg/kg de nitrato de pilocarpina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram injetados por via intraperitoneal para induzir a secreção salivar. A coleta da saliva foi realizada no período da manhã (09 e 11 horas) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. Ração e água foram disponibilizadas *ad libitum* até o momento da anestesia. Os ratos foram posicionados em um ângulo de 45°, de modo que suas cabeças ficassem abaixo de seus corpos, e a saliva foi coletada em béquer de vidro pré-pesados mantidos no gelo. A saliva foi coletada por 10 minutos a partir da primeira gota de saliva (Cypriano *et al.*, 2021), como mostrado na figura 4. A taxa de fluxo salivar foi calculada subtraindo-se a medida do peso pré-coleta da medida do peso pós-coleta do béquer, dividido pelo tempo de coleta. O volume foi determinado considerando a densidade como 1 mg/mL (Oliveira *et al.*, 2023). A taxa de fluxo salivar foi expressa como mililitros de saliva por minuto por quilograma de peso corporal. Para prevenir os efeitos dos ciclos de congelamento-descongelamento nas análises bioquímicas, imediatamente após a coleta, a saliva foi separada em alíquotas, cada uma designada para uma análise bioquímica específica, e armazenada a -80 °C até o processamento. Os volumes das alíquotas de saliva foram suficientes para análise em triplicada dos parâmetros bioquímicos por amostra. Excepcionalmente, a taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tamponante salivar foram analisados imediatamente após a coleta da saliva. O pH salivar foi medido usando um eletrodo específico (Analyzer, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um pHmetro (Thermo Fisher, Orion 720A, MA, EUA), previamente calibrado. A capacidade tamponante foi calculada pelo método de titulação, de acordo com o volume de ácido láctico (0,1 mol/L) usado para reduzir o pH salivar para 4,0 e expressa em mL de ácido láctico (Freitas *et al.*, 2023).

**Figura 4 - Coleta da saliva estimulada**

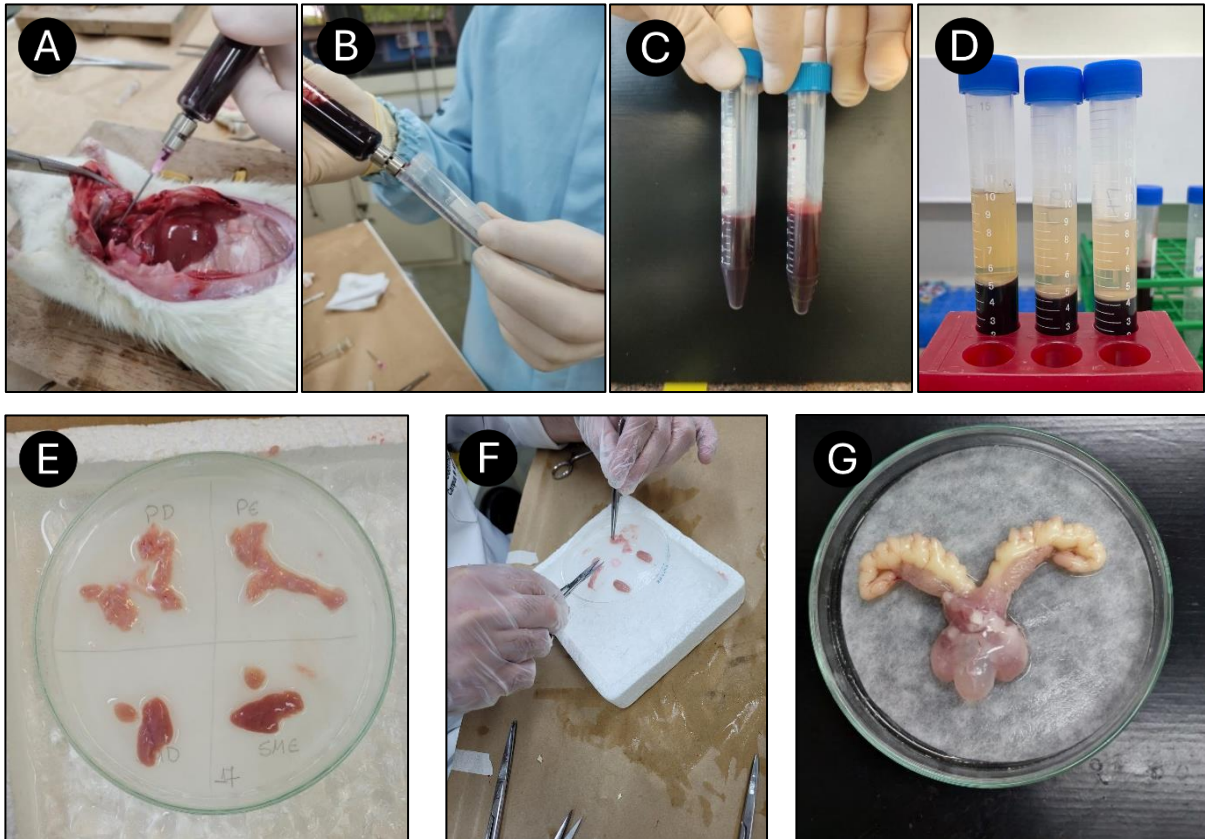


A) Aplicação de pilocarpina intraperitoneal, B) Posicionamento do animal em prancha inclinada, C) Animal posicionado com cavidade bucal voltada para béquer para coleta da saliva, e D) Análise do pH salivar em pHmetro calibrado. Fonte: Imagens capturadas durante os experimentos no Laboratório de Bioquímica da Saliva - UNESP.

### **3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido e sangue**

Após a coleta da saliva, os animais foram submetidos à eutanásia por dessangramento via pun o cardíaca, no período da manhã (9h às 11h) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. O sangue obtido foi centrifugado por 10 minutos a 4  C usando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e após armazenado a -80  C. Foi realizado a exérese das glândulas salivares, que foram divididas em dois grupos, as glândulas do lado direito foram armazenadas a -80 C para posterior análises bioquímicas e as glândulas do lado esquerdo foram posicionadas em cassete e fixadas em soluço de Bowin para realiza o do processamento histológico e para análise morfométrica. Na inten o de avaliar a efetividade do protocolo experimental, a próstata e vesícula seminal foram coletadas e pesadas, como mostrado na figura 5. O uso do  ndice da PA, SM, próstata + vesícula seminal foram usados como índices de massa relativa (rela o  rgo/peso corporal).

**Figura 5 - Eutanásia e coleta de tecidos**



A) Punção cardíaca e dessangramento, B e C) Coleta de sangue em tubos falcon para centrifugar, D) Plasma sanguíneo, E) Glândulas salivares coletadas, F) Limpeza das glândulas salivares, e G) Vesícula seminal e próstata de animal do grupo CT. Fonte: Imagens capturadas durante os experimentos no Laboratório de Bioquímica da Saliva - UNESP.

### 3.6 Parâmetros bioquímicos

Todos os reagentes para os ensaios bioquímicos foram obtidos da Sigma-Aldrich, Alemanha/EUA. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV-Vis (UV-1203, Shimadzu, Japão) e um leitor de microplacas (PowerWave 340, BioTek, EUA). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e padronizadas pelo conteúdo de proteína total. A normalização pelo conteúdo de proteína total permite a avaliação das diferenças nas proporções de analitos bioquímicos presentes na saliva e nos homogenatos de tecido.

### 3.7 Análise da concentração de testosterona total plasmática

Os níveis plasmáticos de testosterona total foram medidos usando imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas com um analisador de imunologia Architect i1000

(Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA) de acordo com as informações do fabricante. Os dados foram expressos em ng/dL.

### **3.8 Análise da função hepática**

Para avaliar possíveis danos hepáticos foram analisados as atividades plasmáticas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os valores foram expressos como U/L.

### **3.9 Análises bioquímicas salivares**

A concentração de proteína total foi determinada usando o método de Hartree-Lowry (Hartree, 1972), com albumina de soro bovino como padrão. A atividade da amilase foi determinada pela reação de cor amido-iodo, conforme descrito anteriormente (Nagy *et al.*, 2001), usando um kit comercial (Labtest Diagnostica S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil). A mistura de reação, contendo o sobrenadante de uma amostra e 0,04% (p/v) de amido solúvel como substrato em tampão fosfato 0,2 mol/L a pH 7,0, foi incubada por 7,5 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de uma solução contendo iodo/iodeto de potássio e HCl. As amostras e as leituras em branco foram feitas a 660 nm. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos de reação sob as condições descritas no ensaio. As atividades da amilase foram avaliadas e normalizadas pela quantidade total de proteínas. As concentrações de sódio e potássio na saliva foram avaliadas usando um analisador de eletrólitos seletivo por íons (modelo 9180, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). Kits colorimétricos comerciais foram usados para quantificar cálcio, fósforo e cloreto (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante para cada teste. Os valores dos eletrólitos foram expressos em mmol/L.

### 3.9.1 Análise da testosterona salivar

As concentrações de testosterona livre salivar foram medidas usando método imunoenzimático com um analisador Cobas Mira (Roche Diagnostica Brasil, Brasil), de acordo com as informações do fabricante. Os dados foram expressos em  $\mu\text{g/dL}$ .

### 3.10 Análise histomorfométrica

As glândulas parótida e submandibular foram obtidas de 10 animais por grupo e fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Para avaliar a morfologia das glândulas salivares, cortes de cinco micrômetros foram feitos e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Um histologista certificado, calibrado e cego, sem conhecimento dos tratamentos, realizou as análises histomorfométricas. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Olympus, XC50, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (Olympus, BX53, Tóquio, Japão), com uma ampliação original de 400x. Seis fotomicrografias foram obtidas a partir de duas seções histológicas de cada glândula. A área total das glândulas salivares foi medida ( $\mu\text{m}^2$ ) usando o software Image J (ImageJ, National Institutes of Health, EUA, versão 1.50i) com a ferramenta "freehand" para delimitar as áreas ocupadas pelas estruturas parenquimatosas (ácinos, ductos, túbulos convolutos granulares e tecido conjuntivo). A área do tecido conjuntivo foi considerada a área total da imagem menos a área do parênquima. A área total da imagem foi quantificada em 100%, e após calcular a área média das 6 imagens, os valores resultantes foram submetidos a um cálculo proporcional para determinar a porcentagem de cada estrutura analisada (Fiais *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022).

### 3.11 Análise imuno-histoquímica de PCNA

As lâminas das glândulas passaram por bloqueio de peroxidase e proteína antes de serem submetidas a reações com anticorpos primários específicos: PCNA 1:200 (PC-10, VP-P980, Vector Laboratories, Newark, Califórnia, EUA) IgG monoclonal de camundongo. As seções foram então incubadas em uma câmara úmida durante a noite, as amostras foram incubadas com anticorpo monoclonal secundário, m-IgGk HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA), à temperatura ambiente, e depois reveladas com diaminobenzidina (DAB), e contra coradas com hematoxilina de Harris a 20%. Para a quantificação, as imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Olympus, XC50,

Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Olympus, BX53, Tóquio, Japão) com uma ampliação original de 400x. As células marcadas com PCNA foram contadas em dez campos de cada glândula salivar por animal usando o software ImageJ (versão 1.50i), e a porcentagem de células positivas (índice de marcação) foi calculada dividindo as células reativas pelo total de células acinares (reativas + não reativas) no campo (Veras *et al.*, 2023).

### **3.12 Análise bioquímica das glândulas salivares**

#### **3.12.1 Preparação dos homogenatos das glândulas salivares**

As glândulas parótida e submandibular foram homogeneizadas para obter sobrenadantes, que foram separados em alíquotas e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para os subseqüentes ensaios bioquímicos realizados em dias diferentes. Para isso, as glândulas foram descongeladas no gelo e lavadas em solução salina gelada (0,9% NaCl, p/v). Os homogenatos de tecido foram preparados usando o homogeneizador Rotor-stator TH (Omni International, Geórgia, EUA) na velocidade máxima por 30 segundos. Para as análises bioquímicas de proteína total, ácido úrico, capacidade antioxidante total, SOD, CAT, GPx, proteína carbonilada, TBARS e capacidade oxidante total, os homogenatos das glândulas foram preparados em 1/5 (p/v) em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) Triton X-100, 10 mmol/L dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e 2 mmol/L fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF). Os homogenatos foram então centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  usando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os sobrenadantes usados para a determinação da GSH foram preparados em 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) contendo 4 mmol/L etilenodiaminotetraacético (EDTA) e centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  usando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Todos os resultados bioquímicos foram normalizados pela concentração total de proteínas, que foi determinada usando o método de Hartree-Lowry, com albumina de soro bovino como padrão (Hartree, 1972).

#### **3.12.2 Análises do dano oxidativo**

A quantificação do dano as proteínas, foi determinado pela concentração de proteína carbonilada, quantificada usando o método alcalino de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Mesquita *et al.*, 2014). O teor de carbonil foi calculado usando o coeficiente de extinção molar

( $\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A peroxidação lipídica foi avaliada medindo a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege; Aust, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A capacidade oxidante total foi avaliada usando o método de Erel, baseado nos oxidantes presentes na amostra, que oxidam o complexo íon ferroso-o-dianisidina para íon férrico. O íon férrico produz um complexo colorido com o alaranjado de xileno em meio ácido. A intensidade da cor foi medida espectrofotometricamente a 560/800 nm. O ensaio foi calibrado com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e os resultados foram expressos em termos de micromoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por grama de proteína (Erel, 2005).

### 3.12.3 Análises da defesa antioxidante não enzimática

A capacidade antioxidante total foi determinada usando o método de redução de ferro, conforme descrito por Benzie e Strain (Benzie; Strain, 1996). A concentração de GSH foi medida usando 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB) seguindo o método espectrofotométrico, descrito por Beutler, Duron e Kelly (1963). A quantidade de GSH foi determinada usando o coeficiente de extinção molar conhecido de GSH ( $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e a concentração foi expressa por grama de proteína total. A concentração de ácido úrico foi medida usando um kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), usando uricase no ensaio para converter ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio (Trivedi *et al.*, 1978).

### 3.12.4 Análises da defesa antioxidante enzimática

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm, medindo a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em um tampão Tris-HCl de 50 mmol/L (pH 8,2) contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (Marklund; Marklund, 1974). A atividade da CAT foi determinada a 240 nm, medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio em um tampão fosfato de potássio de 50 mmol/L (pH 7,0) (Aebi, 1984). As unidades de atividade enzimática foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), onde uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de peróxido de hidrogênio por minuto. A atividade da GPx foi determinada a 340 nm

usando o método que emprega peróxido de di-terc-butila como substrato da reação. O GSH é oxidado pela GPx, gerando glutationa oxidada (GSSG), que é então convertida de volta em GSH pela glutationa redutase (GR), consumindo uma molécula de NADPH nessa reação (Wendel, 1981). A atividade enzimática foi determinada monitorando o consumo de NADPH em um meio contendo tampão fosfato de sódio de 50 mmol/L (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de di-terc-butila e as amostras. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma unidade de atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

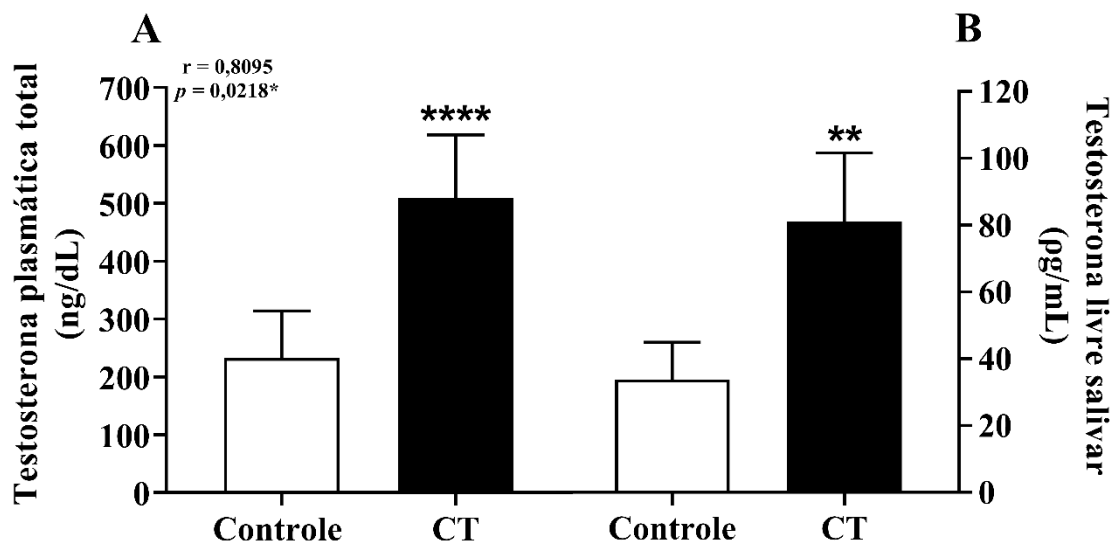
Os dados paramétricos são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados não paramétricos são apresentados como mediana e intervalo interquartil [IIQ]. Inicialmente, os dados foram analisados quanto à normalidade usando o teste estatístico de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste *t* de Student, enquanto os dados não paramétricos foram analisados usando o teste de Mann-Whitney. As correlações entre as concentrações de testosterona salivar e plasmática foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Para todas as análises,  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentração de testosterona plasmática e salivar

O tratamento com CT por 6 semanas aumentou a concentração total de testosterona plasmática em 120% ( $p < 0,0001$ ; Figura 6A) e a testosterona livre salivar em 140% ( $p < 0,01$ ; Figura 6B) em comparação com o grupo controle. Houve uma correlação altamente significativa entre a testosterona plasmática e salivar, com um coeficiente de correlação de  $r = 0,8095$  ( $p = 0,0218$ ).

**Figura 6 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nas concentrações de testosterona plasmática e livre salivar de ratos Wistar**



Concentração de testosterona total plasmática (A) e testosterona livre salivar (B). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$  ratos/grupo. Os resultados foram comparados usando o teste  $t$  de Student. A correlação entre as concentrações de testosterona plasmática e salivar foi analisada pelo teste de correlação de Pearson. Valor de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $****p < 0,0001$ ).

## **5.2 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no peso corpóreo inicial e final, consumo de água, comida, coeficiente de eficiência alimentar, atividade de AST e ALT, peso absoluto e relativo da próstata, glândulas parótidas e submandibulares e proteína total das glândulas salivares**

Uma maior atividade de ALT ( $p < 0,05$ ) e AST ( $p < 0,05$ ) foi observado em ratos tratados com CT (Tabela 1). O consumo de água não apresentou diferenças significativas entre os grupos, no entanto, o consumo de comida ( $p < 0,01$ ), o coeficiente de eficiência alimentar ( $p < 0,0001$ ) e o ganho de peso corporal final ( $p < 0,01$ ) foram menores no grupo CT ao final do período de tratamento, quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). O peso absoluto e relativo da próstata ( $p < 0,0001$ ) e da próstata com vesícula seminal ( $p < 0,0001$ ) aumentou significativamente em comparação ao grupo controle. O peso absoluto e relativo das glândulas parótidas não diferiu após o tratamento. Por outro lado, o peso absoluto ( $p < 0,01$ ) e relativo ( $p < 0,001$ ) da glândula submandibular aumentaram com o tratamento (Tabela 1). A concentração de proteína total nos homogeneizados das glândulas parótida e submandibular não diferiram com o tratamento (Tabela 1).

**Tabela 1 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no peso corpóreo inicial e final, consumo de comida e água, coeficiente de eficiência alimentar, atividade de AST e ALT, peso absoluto e relativo da próstata, glândulas e proteína total tecidual**

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>CT</b>
<b>Atividade de AST (U/L)</b>	122,4 ± 17,76	146,9 ± 26,04*
<b>Atividade de ALT (U/L)</b>	74,44 ± 8,26	88,67 ± 15,71*
<b>Consumo de comida<sup>#</sup> (kg/semana/animal)</b>	205,4 [188,7-207,2]	182,1 [172,8-193,4] <sup>##</sup>
<b>Coeficiente de eficiência alimentar (g/kg)</b>	55,51 [49,80-65,86]	23,53 [18,63-24,32] <sup>####</sup>
<b>Consumo de água (L/semana/grupo)</b>	1,15 ± 0,14	1,09 ± 0,05
<b>Peso corpóreo inicial (g)</b>	433,4 ± 26,4	431,80 ± 25,31
<b>Peso corpóreo final (g)</b>	504,80 ± 29,68	457,60 ± 31,02**
<b>Peso absoluto da próstata (g)</b>	1,17 ± 0,24	2,08 ± 0,24****
<b>Peso relativo da próstata</b>	2,35 ± 0,52	4,63 ± 0,50****
<b>Peso absoluto da próstata + vesícula seminal (g)</b>	2,99 ± 0,36	5,76 ± 0,40****
<b>Peso relativo da próstata + vesícula seminal</b>	6,05 ± 0,82	12,86 ± 0,81****
<b>Peso absoluto da glândula parótida (mg)</b>	333,2 ± 30,30	306,9 ± 37,44
<b>Peso absoluto da glândula submandibular (mg)</b>	332,0 ± 16,90	378,3 ± 61,71*
<b>Peso relativo da glândula parótida</b>	0,05 ± 0,09	0,706 ± 0,08
<b>Peso relativo da glândula submandibular</b>	0,676 ± 0,02	0,834 ± 0,11***
<b>Proteína total da glândula parótida (mg/g de tecido)</b>	25,82 ± 1,74	24,92 ± 1,99
<b>Proteína total da glândula submandibular (mg/g de tecido)</b>	32,63 ± 2,29	30,60 ± 2,22

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil [IIQ], de acordo com a normalidade verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. n = 10 ratos/grupo. Os dados paramétricos foram comparados usando o teste *t* de Student\*, enquanto os dados não paramétricos foram comparados usando o teste de Mann-Whitney<sup>#</sup>. Para todas as análises, valores de *p* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001; \*\*\*\**p* < 0,0001; ##*p* < 0,01; ####*p* < 0,0001).

### 5.3 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros bioquímicos salivares

A dose supra fisiológica de CT não alterou o fluxo salivar, o pH e a capacidade tamponante da saliva (Tabela 2). A concentração de proteína total aumentou significativamente no grupo CT ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle (Tabela 2). A atividade da enzima amilase salivar, normalizada pela proteína total, apresentou uma redução na atividade ( $p < 0,05$ ; Tabela 2) em comparação ao grupo controle, enquanto a atividade da amilase não normalizada não demonstrou diferenças entre os grupos (Tabela 2). Houve uma diminuição nas concentrações de cálcio ( $p < 0,01$ ), fosfato ( $p < 0,01$ ) e potássio ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle (Tabela 2), não sendo observadas diferenças significativas nas concentrações de sódio e cloreto entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tampão, proteína total, amilase, cálcio, fosfato, potássio, sódio e cloreto**

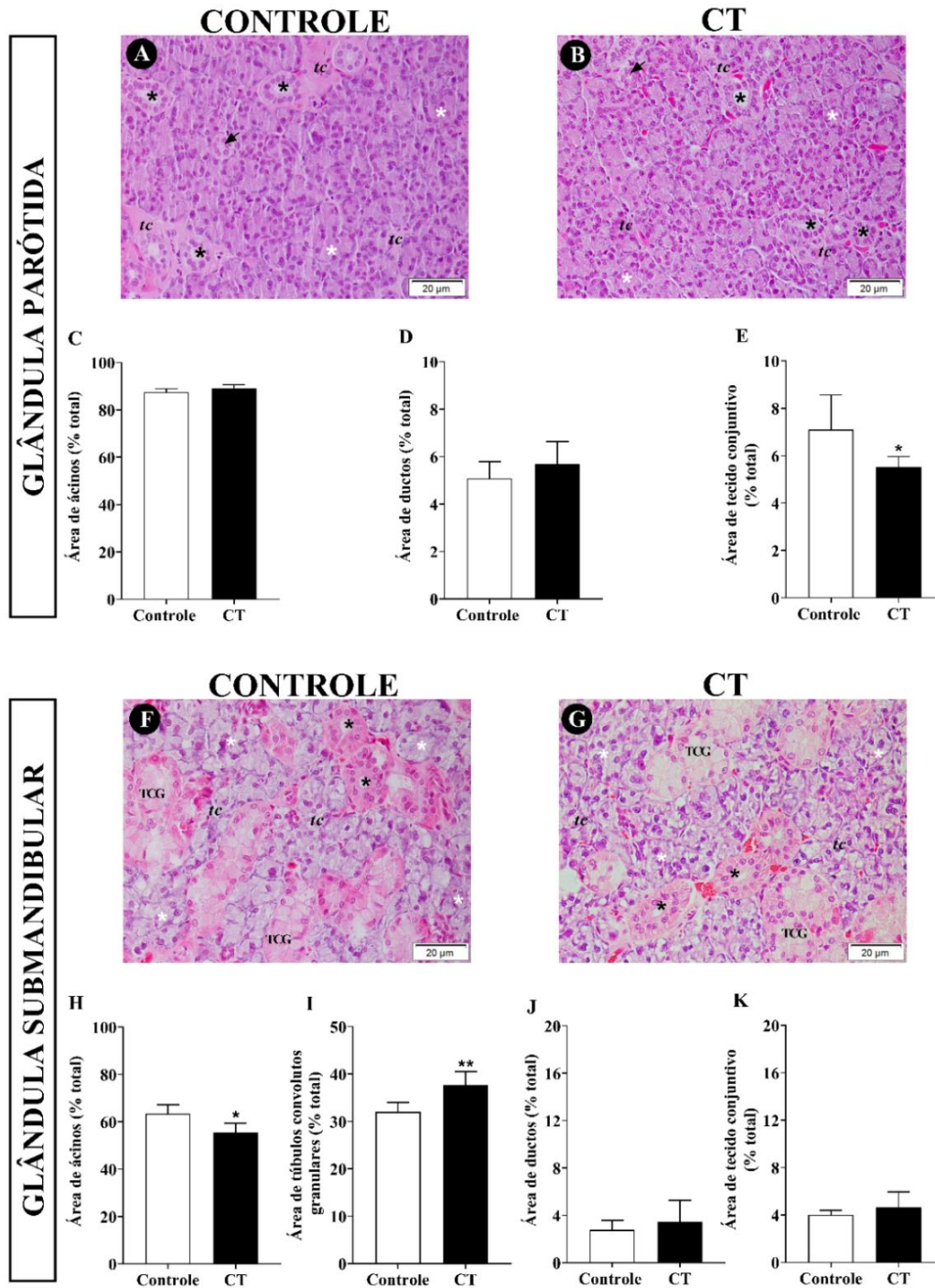
Parâmetros	Controle	CT
Fluxo salivar (mL/min/kg de massa corpórea)	0,39 ± 0,05	0,42 ± 0,04
pH	9,27 ± 0,14	9,13 ± 0,14
Capacidade tamponante (mL de ácido láctico/mL de saliva)	0,58 ± 0,05	0,58 ± 0,04
Proteína total (g/L)	0,91 ± 0,12	1,13 ± 0,10***
Atividade da amilase (U/g de proteína total)	6135 ± 700,1	5005 ± 1194*
Atividade da amilase (U/dL)	56743 ± 714	56475 ± 10011
Cálcio (mg/dL)	6,92 ± 1,13	5,35 ± 1,26**
Fosfato (mg/dL)	2,83 ± 0,61	1,95 ± 0,60**
Potássio (mmol/L)	4,69 ± 0,29	4,240 ± 0,53*
Sódio (mmol/L)	125,1 ± 1,85	124,3 ± 3,19
Cloreto (mmol/L)	51,95 ± 10,12	50,67 ± 5,73

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram comparados usando teste *t* de Student não-pareado. Para todas as análises, valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### **5.4 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares**

A análise de H&E revelou alterações histomorfométricas entre os grupos. A Figura 7 apresenta fotomicrografias da glândula parótida (A e B) e da glândula submandibular (F e G). As áreas acinares (Figura 7C) e ductais (Figura 7D) na glândula parótida foram semelhantes entre os grupos, enquanto o CT diminuiu a área do tecido conjuntivo ( $p < 0,05$ ; Figura 7E). Em contraste, uma dose supra fisiológica de CT diminuiu significativamente a área acinar ( $p < 0,05$ ; Figura 7H) e aumentou a área de túbulos convolutos granulares ( $p < 0,01$ ; Figura 7I), enquanto as áreas ductal (Figura 7J) e do tecido conjuntivo (Figura 7K) foram semelhantes entre os grupos.

**Figura 7 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros histomorfológicos das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar**

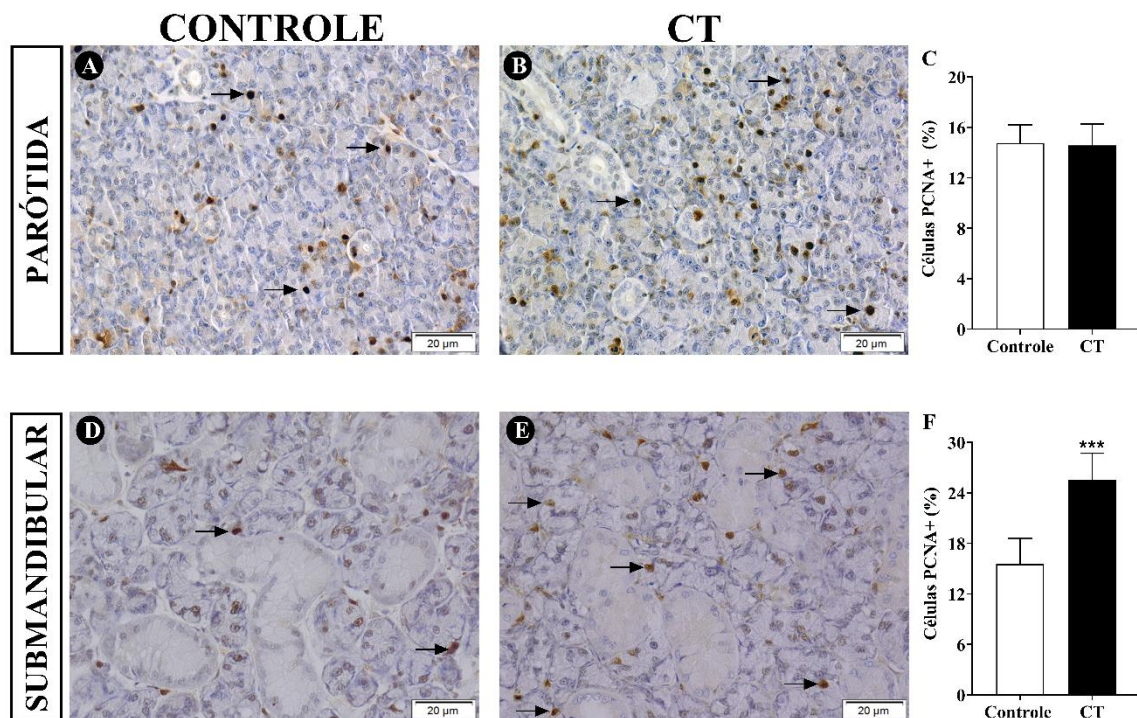


Fotomicrografias da glândula parótida (A e B) e da glândula submandibular (F e G) e análises histomorfológicas da área acinar (C e H), área do ducto (D e J), área de túbulos convolutos granulares (I) e tecido conjuntivo (E e K). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 10$  ratos/grupo. Os resultados foram comparados usando o teste  $t$  de Student não pareado. Para todas as análises, valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas: tc, tecido conjuntivo; TCG, túbulos convolutos granulares. Símbolos: asterisco branco indica ácinos glandulares; asterisco preto indica ducto estriado; seta preta indica ducto intercalado.

## 5.5 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na imunomarcação para PCNA

A localização imuno-histoquímica do PCNA foi prevalente nos núcleos das células acinares, em comparação com as células estromais e ductais da glândula parótida (8A e B) e glândulas submandibulares (Figura 8D e E). Na glândula parótida não houve diferenças estatisticamente significativas nas células PCNA+ (Figura 8C), enquanto na glândula submandibular a porcentagem de células PCNA+ foi maior no grupo CT, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ; Figura 3E).

**Figura 8 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na imunomarcação para PCNA das glândulas parótida e submandibular**

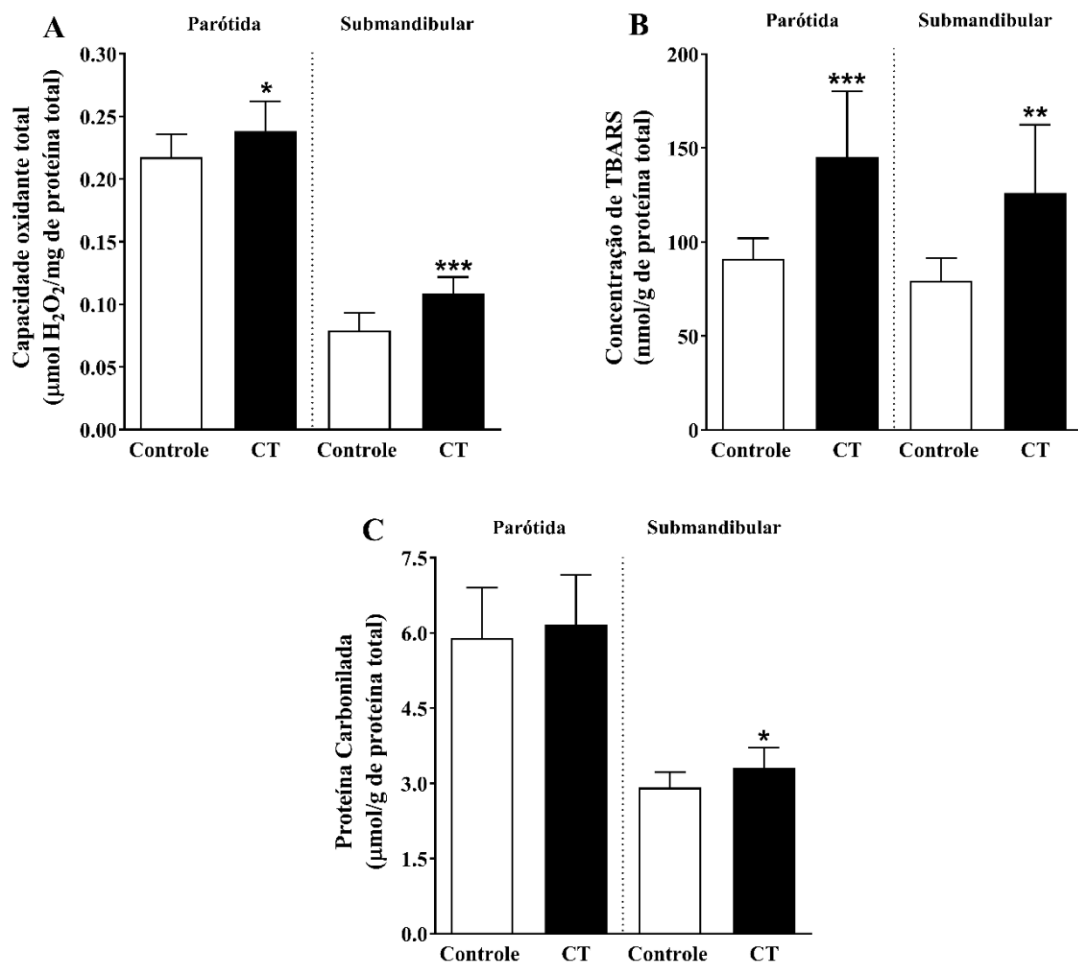


Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na coloração imuno-histoquímica de PCNA nas glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar machos. Grupo controle de parótida (A), grupo CT (B) e gráfico de barras mostrando o número médio de células positivas para PCNA entre os grupos (C). Grupo controle submandibular (D), grupo CT (E) e gráfico de barras mostrando o número médio de células positivas para PCNA entre os grupos (F). As células PCNA+ foram contadas em 10 campos diferentes em cada seção sob ampliação de 400 $\times$ . Barra de escala 20  $\mu$ m. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram comparados usando o teste t de Student não pareado. Para todas as análises estatísticas (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

## 5.6 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT no dano oxidativo das glândulas salivares

O tratamento com CT aumentou a capacidade oxidante total nas glândulas parótida ( $p < 0,05$ ) e submandibular ( $p < 0,001$ ; Figura 9A). Da mesma forma, houve um aumento nas concentrações de peroxidação lipídica nas glândulas parótida ( $p < 0,001$ ) e submandibular ( $p < 0,01$ ; Figura 9B). No entanto, o tratamento não demonstrou danos significativos às proteínas nas glândulas parótidas, enquanto nas glândulas submandibulares houve um aumento no conteúdo de proteína carbonilada ( $p < 0,05$ ; Figura 9C).

**Figura 9 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores do dano oxidativo**

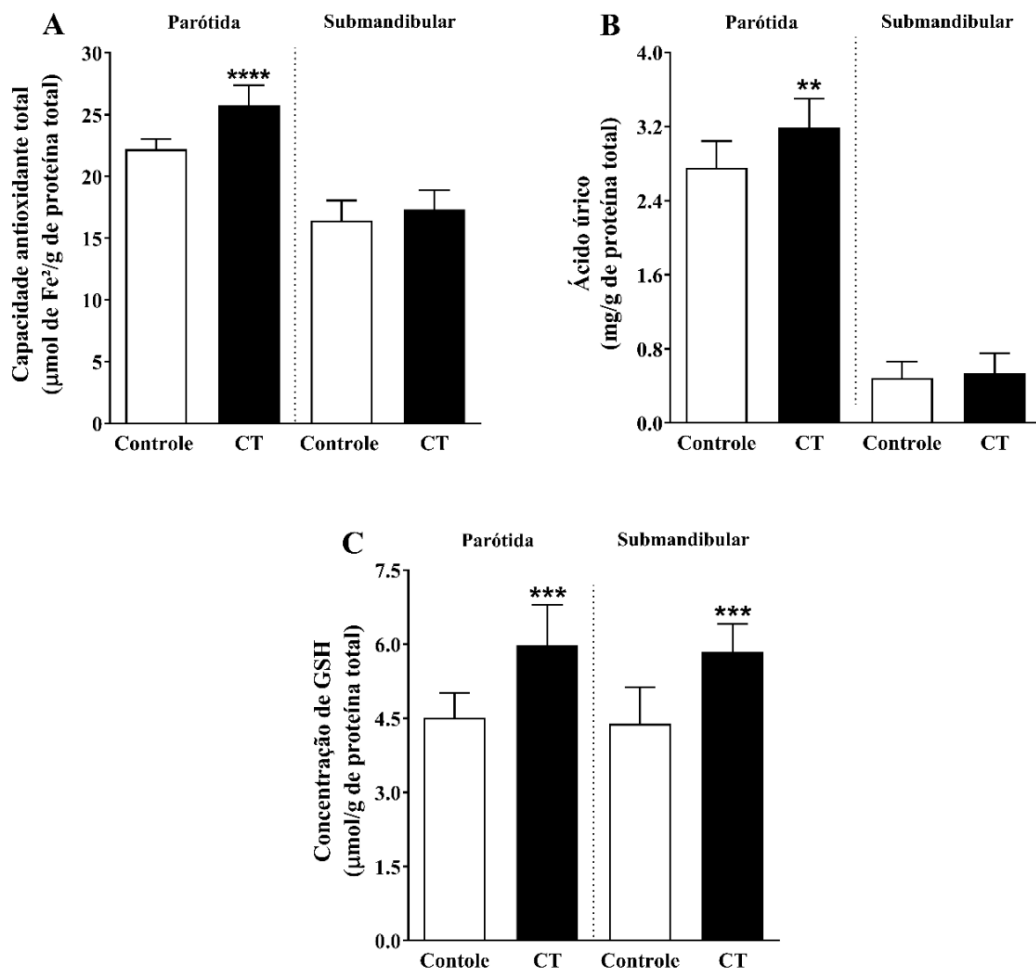


Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na capacidade oxidante total (A), TBARs (B) e proteína carbonilada (C) no homogenato das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram comparados usando teste *t* de Student não-pareado. Para todas as análises, valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5.7 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na defesa antioxidante não-enzimática das glândulas salivares

O tratamento com CT aumentou significativamente a capacidade antioxidante total na glândula parótida ( $p < 0,0001$ ), enquanto permaneceu similar em ambos os grupos na glândula submandibular (Figura 10A). Da mesma forma, na análise da concentração de ácido úrico, houve um aumento na glândula parótida ( $p < 0,01$ ), mas nenhuma alteração foi observada na glândula submandibular (Figura 10B). Em contraste, a concentração de GSH apresentou um aumento significativo em ambas as glândulas ( $p < 0,001$ ; Figura 10C).

**Figura 10 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores da capacidade antioxidante não - enzimática**

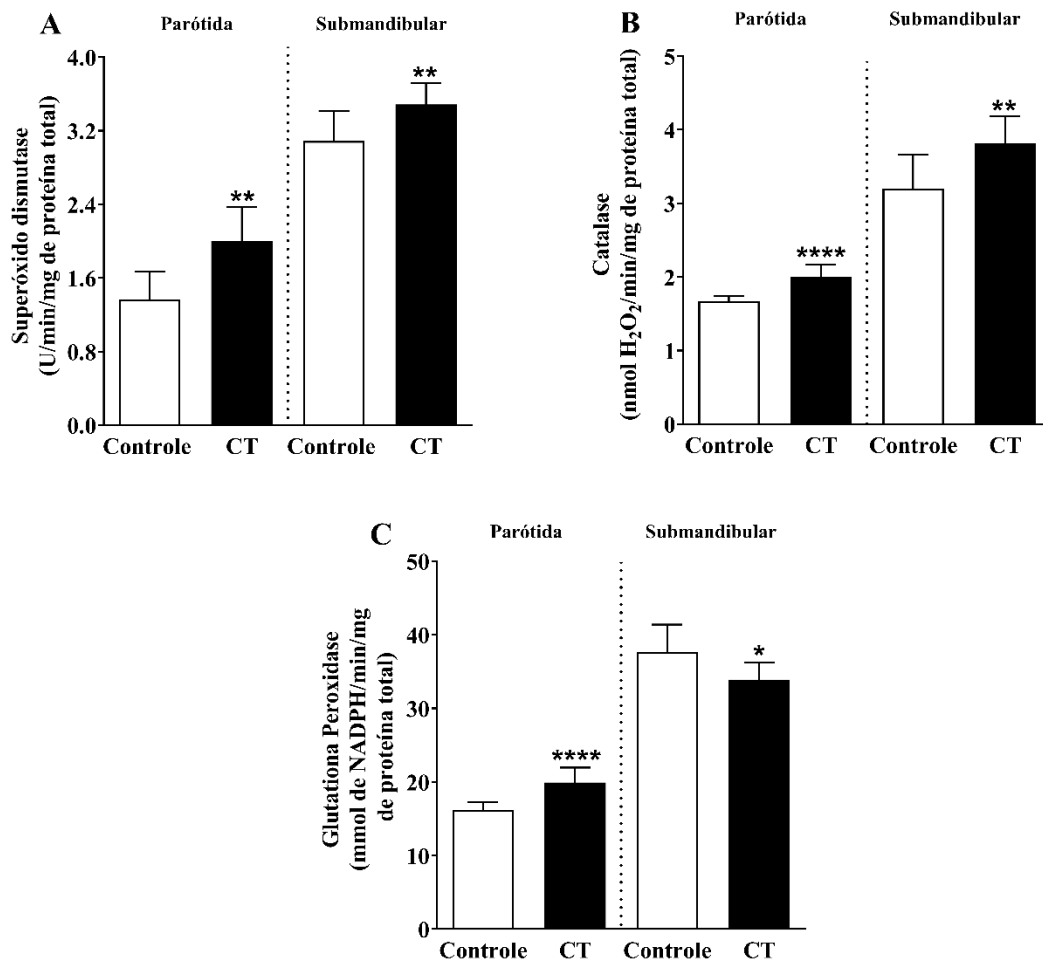


Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na capacidade antioxidante total (A), ácido úrico (B) e GSH (C) no homogenato das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram comparados usando teste  $t$  de Student não-pareado. Para todas as análises, valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 5.8 Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT na defesa antioxidante enzimática das glândulas salivares

O tratamento levou à intensificação da atividade de SOD no grupo CT em ambas as glândulas ( $p < 0,01$ ; Figura 11A). O mesmo padrão de aumento foi observado na atividade de CAT (glândula parótida  $p < 0,0001$ ; glândula submandibular  $p < 0,01$ ; Figura 11B). No entanto, a atividade de GPx apresentou um aumento significativo na glândula parótida ( $p < 0,0001$ ) e uma diminuição na glândula submandibular no grupo CT ( $p < 0,05$ ; Figura 11C).

**Figura 11 - Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos marcadores da defesa antioxidante enzimática**



Efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nas atividades de SOD (A), catalase (B) e GPx (C) no homogenato das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram comparados usando teste *t* de Student não-pareado. Para todas as análises, valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O estudo atual analisou os efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de CT nos parâmetros bioquímicos salivares, histomorfometria, imuno-histoquímica e estado redox das glândulas parótida e submandibular de ratos Wistar. Após seis semanas de tratamento com uma dose semanal de CT, os principais resultados foram os seguintes: 1. CT induziu a elevação supra fisiológica nas concentrações de testosterona plasmática e salivar; 2. CT não alterou a taxa de fluxo salivar, pH ou capacidade tamponante; 3. CT reduziu as concentrações dos eletrólitos cálcio, fosfato e potássio na saliva; 4. CT aumentou os pesos absoluto e relativo apenas da glândula submandibular; 5. CT reduziu a área acinar e aumentou a área dos túbulos convolutos granulares na glândula submandibular; 6. CT intensificou a marcação de PCNA nas células acinares da glândula submandibular; e 7. CT promoveu dano oxidativo em ambas as glândulas. Os resultados indicam que a dose supra fisiológica de 20 mg/kg de CT promove danos funcionais, alterações histomorfométricas, estimula a proliferação celular, e induz dano oxidativo nas glândulas parótida e submandibular. Como resultado, a hipótese do trabalho foi confirmada.

Assim como o enantato de testosterona, propionato e undecanoato, o cipionato é um éster solúvel em óleo com funções anabólicas e androgênicas, possuindo uma meia-vida de cerca de seis dias (Bi *et al.*, 2018). Ele foi aprovado para comercialização pela Food and Drug Administration nos Estados Unidos da América, pelas agências reguladoras europeias responsáveis por produtos medicinais, e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil (ANVISA). A aplicação intramuscular de CT a 20 mg/kg/semana corresponde a uma dose translacional usada para mimetizar o uso abusivo em humano (Bi *et al.*, 2018). Além disso, essa dose induziu lesões teciduais através de dano oxidativo no fígado (Sadowska-Krepa *et al.*, 2020), coração (Karbasi *et al.*, 2018) e hipocampo de ratos (Joksimović *et al.*, 2017). O protocolo terapêutico experimental utilizado foi eficaz em aumentar simultaneamente as concentrações de testosterona plasmática e salivar nos animais, consistente com achados clínicos anteriores que sugerem a saliva como um método não invasivo para análise da concentração de testosterona, uma vez que ela se correlaciona positivamente com as concentrações sanguíneas (Arregger *et al.*, 2007; Khan-Dawood; Choe; Dawood, 1984; Rilling *et al.*, 1996). Esses resultados também coincidem com o aumento dos marcadores de dano hepático, AST e ALT, que são efeitos colaterais frequentes de altas doses de enantato de testosterona (Sadowska-Krepa *et al.*, 2017), decanoato de nandrolona (Vieira *et al.*, 2008) e cipionato de testosterona em ratos (Santos *et al.*, 2018).

Os animais tratados com dose supra fisiológica de CT apresentaram peso corporal final menor, o que pode estar parcialmente associado à redução do apetite, ingestão de comida e coeficiente de eficiência alimentar (Heredia *et al.*, 2007; Nunez, 1982; Shahraki; Mirshekari; Shahraki, 2015). Da mesma forma, consistente com nossos achados, doses supra fisiológicas de EAA parece não influenciar o consumo de água (Shahraki; Mirshekari; Shahraki, 2015; Yu-Yahiro *et al.*, 1989). Esses efeitos estão relacionados à dose, frequência e potência farmacológica dos diferentes EAAs. Em ratos foi demonstrado que a suplementação androgênica reduz o ganho de peso em animais tratados com decanoato de nandrolona (Lindblom *et al.*, 2003; Magalhães *et al.*, 2020; Shahraki; Mirshekari; Shahraki, 2015; Yu-Yahiro *et al.*, 1989), enantato de testosterona (Sadowska-Krepa *et al.*, 2017, 2020), propionato de testosterona (Nunez, 1982; Pirompol *et al.*, 2016), sulfato de potássio de testosterona (Kim; Wood, 2014) e testosterona cristalina (Valente-Santos *et al.*, 2023). Fatores que apoiam esses resultados incluem a capacidade da testosterona de promover lipólise e reduzir a gordura corporal (Pergola, 2000; Petersson *et al.*, 2014). O aumento dos pesos absoluto e relativo da próstata e vesícula seminal pode estar relacionado à hiperplasia prostática benigna induzida por EAA, como descrito em ratos tratados com 10 mg/kg de enantato de testosterona por 4 semanas (Saddick, 2021). Além disso, flutuações nas concentrações plasmáticas de testosterona podem apresentar desafios para órgãos como a próstata e vesícula seminal, que são ricos em receptores androgênicos. Esses desafios podem afetar seu crescimento, diferenciação e manutenção da função secretória (Devlin; Simms; Maitland, 2021; Madersbacher; Sampson; Culig, 2019; Nicholson; Ricke, 2011). Nossos achados apoiam as respostas previamente relatadas, pois observamos um aumento nos pesos absoluto e relativo da próstata e vesícula seminal, possivelmente induzido pela dose supra fisiológica de CT.

O fluxo salivar, pH e capacidade tamponante foram semelhantes entre os grupos experimentais, apesar das perturbações no estado redox evidenciadas nas glândulas parótida e submandibular. A coleta de saliva foi realizada através da estimulação com pilocarpina, um agente parassimpaticomimético que ativa os receptores colinérgicos M1 e M3 das células acinares, induzindo um aumento no cálcio intracelular, que leva à secreção de saliva isotônica primária contendo água e cloreto de sódio (Narita *et al.*, 2019; Proctor; Shaalan, 2021). Posteriormente, essa saliva se torna hipotônica após passar por modificações no sistema ductal, caracterizadas pela absorção de cloreto de sódio e secreção de bicarbonato e potássio (Petersson *et al.*, 2014; Proctor; Shaalan, 2021). No presente estudo, a manutenção da secreção de sódio e cloreto na saliva em animais tratados com CT é consistente com o resultado do fluxo salivar,

indicando uma função secundária do ducto com aumento da reabsorção de potássio, cálcio e fosfato neste modelo experimental. Essas alterações na composição eletrolítica podem estar relacionadas, pelo menos em parte, ao aumento da área dos túbulos convolutos granulares, que se desenvolvem em ductos estriados e intercalados. Por outro lado, ratos orquiectomizados com deficiência de testosterona desenvolvem um aumento no fluxo salivar, aumentando a secreção salivar de cloreto, cálcio e fosfato (Cypriano *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022). Portanto, podemos sugerir que a testosterona desempenha um papel importante na regulação da excreção e reabsorção de eletrólitos nas glândulas salivares, semelhante ao que ocorre nos rins de roedores (Hsu *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2020; Toot *et al.*, 2008).

A taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tampão têm uma relação definida com a atividade cariogênica. Os sistemas tampão salivares, incluindo proteínas, fosfato inorgânico e o sistema ácido carbônico/bicarbonato, desempenham um papel crítico na manutenção de um equilíbrio ácido-base adequado e pH relativamente estável. Portanto, podemos sugerir que o aumento na secreção de proteína total poderia compensar a redução de fosfato em animais tratados com CT. Além disso, o aumento na secreção de bicarbonato na saliva estimulada também deve ser considerado, pelo menos em parte, como um componente chave na manutenção da capacidade tamponante salivar em nosso modelo experimental (Roussa, 2011). No entanto, a manutenção da taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tamponante deve ser considerada com cautela, pois a redução na secreção de cálcio e fosfato, eletrólitos cruciais no equilíbrio dos processos de desmineralização e remineralização dentária (Llena-Puy, 2006), foi menor nos animais tratados, o que poderia refletir um risco maior de cáries dentárias.

O aumento na concentração de proteína total na saliva induzido pelo CT pode ser considerado um reflexo do efeito anabólico da testosterona nas glândulas salivares, como também foi observado em outros tecidos andrógeno dependentes, como a vesícula seminal (Higgins; Burchell; Mainwaring, 1976), próstata (Mora; Prins; Mahesh, 1996), células cardíacas (Papamitsou *et al.*, 2011) e músculos esqueléticos (Ustunel; Akkoyunlu; Demir, 2003). As atividades da amilase salivar sugerem que este aumento na proteína total é devido ao aumento da síntese e secreção de proteínas não amilase, pois não identificamos diferenças na atividade da amilase entre os grupos, enquanto a atividade específica normalizada pela proteína foi menor no grupo tratado. No entanto, as concentrações de proteína total do tecido das glândulas parótida e submandibular foram semelhantes entre os grupos experimentais, o que pode ser uma consequência da secreção de proteínas salivares induzida pela pilocarpina. O aumento na secreção de proteína total na saliva dos ratos tratados coincide com o aumento na

área dos túbulos convolutos granulares nas glândulas submandibulares, estruturas exclusivas de roedores que são dependentes de andrógenos (Gresik, 1994). Essas estruturas são ricas em grânulos secretórios contendo proteínas e peptídeos biologicamente ativos, como proteína de choque térmico, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento nervoso (Miyaji; Aiyama; Kurabuchi, 2008; Thulesen *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2010). A síntese e a quantidade de grânulos secretórios nos túbulos convolutos granulares estão diretamente relacionadas à concentração de testosterona (Hosoi; Nakamura; Ueha, 1977; Kaiho; Nakamura; Kumegawa, 1975). Maiores concentrações de proteína total salivar têm sido associadas a uma maior prevalência de cáries dentárias e doença periodontal (Kejriwal *et al.*, 2014; Shaila; Pai; Shetty, 2013; Tulunoglu; Demirtas; Tulunoglu, 2006), o que pode estar relacionado à formação pronunciada de uma película adquirida, consistindo em uma camada de proteínas e peptídeos salivares adsorvidos na superfície do dente, que serve como substrato para a adesão e colonização de bactérias orais (Chawhuaveang *et al.*, 2021). Finalmente, nossos achados, quando comparados aos encontrados em ratos orquiectomizados, nos levam a sugerir que as glândulas parótidas são mais vulneráveis à deficiência de testosterona, levando a prejuízos na sinalização celular muscarínica (Busch; Borda, 2003) e adrenérgica (Busch; Borda, 2002) e comprometimento na secreção de proteína total e amilase.

Como observado neste estudo, as glândulas submandibulares de ratos eugonadais são capazes de responder à dose supra fisiológica de CT, como evidenciado pelo aumento no peso absoluto e relativo deste órgão. Em contraste, os efeitos estruturais do tratamento com CT nas glândulas parótidas foram limitados a uma redução no estroma, o que pode ser considerado uma consequência do leve aumento nas áreas de ácinos e ductos. Este resultado reforça a ideia de que os efeitos dos andrógenos na regulação da síntese e secreção de saliva nas glândulas parótidas podem ocorrer às custas de alterações celulares envolvendo ácinos, ductos e estroma. Por outro lado, os efeitos do CT nas glândulas submandibulares podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo aumento na área dos túbulos convolutos granulares e, secundariamente, pela maior taxa de proliferação celular nos ácinos, como evidenciado pelo aumento na porcentagem de células positivas para PCNA. O aumento na área total dos ductos também foi considerado uma adaptação histológica responsável pelo aumento no peso absoluto e relativo das glândulas submandibulares em ratos machos eugonadais após a implantação subcutânea de testosterona cristalina (Valente-Santos *et al.*, 2023). Esses efeitos correspondem à localização e maior prevalência de receptores de andrógenos nas glândulas submandibulares de roedores (Li *et al.*, 2005; Nemoto *et al.*, 1985). Além disso, o PCNA é considerado um marcador de

atividade maligna em cânceres de glândulas salivares (Alves *et al.*, 2004), o que levanta preocupações sobre o potencial risco carcinogênico do tratamento com CT nas glândulas submandibulares, pois a carcinogenicidade dos EAA está diretamente associada à indução da proliferação celular (Chimento *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2017). Nossa preocupação é reforçada por evidências de que o uso abusivo de EAA foi considerado um fator predisponente para a patogênese da sialometaplasia necrotizante em um jovem fisiculturista (Abdalla-Aslan *et al.*, 2020).

A testosterona é capaz de elevar a taxa metabólica basal e, conseqüentemente, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) estimulando as vias da xantina oxidase, NADPH oxidases (Chignalia *et al.*, 2012), ciclooxigenase-2 (Chignalia *et al.*, 2015) e promovendo disfunção mitocondrial. Além disso, pode estimular a geração de ânion superóxido e óxido nítrico, aumentando a produção de peroxinitrito e estimulando a apoptose (Puttabyatappa *et al.*, 2013). Embora as glândulas salivares tenham um potente sistema de defesa antioxidante para manter o equilíbrio redox (Lasisi *et al.*, 2021), foi observado dano oxidativo em ambas as glândulas salivares neste estudo, com marcadores elevados de capacidade oxidante total e peroxidação lipídica em ambas as glândulas, e danos proteicos apenas na glândula submandibular. De acordo com nossos achados, lesões teciduais e condições inflamatórias foram associadas ao aumento na produção de EROs na gordura retroperitoneal (Magalhães *et al.*, 2020), rins e fígado (Dornelles *et al.*, 2017) de ratos Wistar após altas doses de EAA. O aumento de EROs também foi evidenciado no córtex cerebral (Bueno *et al.*, 2017) e fígado (Carvalho *et al.*, 2020) de ratos Wistar tratados simultaneamente com undecilenato de boldenona e estanozolol, mostrando alterações comportamentais e dano hepático nos animais. Por outro lado, a redução na testosterona sanguínea em homens (Unluhizarci *et al.*, 2020) e bezerros (Sezer *et al.*, 2021) também foi associada a um aumento na capacidade oxidante total, indicando que flutuações extremas nas concentrações de testosterona aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio. Da mesma forma, altas doses de EAA foram capazes de promover dano oxidativo lipídico em outros tecidos, com aumento nas concentrações de peroxidação lipídica no soro de ratos tratados com undecanoato de testosterona, o que foi associado a danos renais (Memudu; Dongo, 2023). Nos testículos (Saddick, 2021), rins (Salem; Alnahdi, 2020) e fígado (Pey *et al.*, 2003) de ratos Wistar tratados com doses supra fisiológicas de EAA, foi identificado danos às funções desses órgãos, devido ao aumento na peroxidação lipídica. Além disso, o aumento na proteína carbonilada nos rins de ratos tratados com decanoato de nandrolona perturbou a homeostase redox deste órgão (Frankenfeld *et al.*, 2014). As evidências

encontradas mostram que a dose supra fisiológica de CT utilizada promoveu dano oxidativo nas glândulas salivares, especialmente na glândula submandibular, que devido à presença de receptores de andrógenos se torna mais vulnerável em comparação com a glândula parótida. Portanto, as mudanças na composição da saliva também podem estar relacionadas ao dano oxidativo observado nas glândulas salivares.

Embora o tratamento tenha aumentado os marcadores de dano oxidativo, tanto a capacidade antioxidante enzimática quanto a não enzimática também foram maiores em ambas as glândulas salivares dos grupos tratados, o que pode representar uma resposta compensatória ao estresse oxidativo leve a moderado induzido pelo CT. Em particular, a maior capacidade antioxidante total nas glândulas parótidas de ratos tratados com CT podem ser resultado do aumento de antioxidantes endógenos, como ácido úrico e GSH. Da mesma forma, o tratamento com EAA também levou a um aumento em GSH e capacidade antioxidante total no soro de coelhos (Germanakis *et al.*, 2013). Além disso, o estanozolol causou aumentos simultâneos no dano oxidativo lipídico e GSH no fígado de ratos (Pey *et al.*, 2003). Por outro lado, o aumento no dano oxidativo lipídico foi associado à redução na capacidade antioxidante total nos testículos (Tóthová *et al.*, 2013) e no hipocampo (Habib Agahi; Mosallanejad; Salehi, 2022), bem como a concentrações mais baixas de GSH no fígado, rins (Dornelles *et al.*, 2017), córtex cerebral e hipocampo (Bueno *et al.*, 2017). As maiores concentrações de GSH nas glândulas salivares podem estar relacionadas à capacidade do CT de estimular a atividade da glutathione redutase, conforme observado no fígado de ratos tratados com uma combinação de testosterona sintética (Arazi; Mohammadjafari; Asadi, 2017). Por outro lado, a maior concentração de ácido úrico na glândula parótida pode refletir a estimulação da xantina oxidase pela testosterona (Olatunji; Areola; Badmus, 2018). No entanto, a capacidade antioxidante total e a concentração de ácido úrico permaneceram na glândula submandibular dos animais tratados, o que pode ser, pelo menos em parte, uma consequência da maior intensidade de estresse oxidativo induzido pelo CT, conforme evidenciado pelo aumento na proteína carbonilada, cuja maior concentração também foi relacionada à redução da xantina oxidase (Veskoukis *et al.*, 2008). A ampla variedade de respostas de defesa antioxidante ao estresse oxidativo induzido por EAA pode estar relacionada a diferenças nos protocolos experimentais, especialmente discrepâncias associadas às doses, vias e frequência de administração, bem como as propriedades tóxicas específicas devido a diferenças estruturais entre os diferentes EAAs.

Da mesma forma, os diferentes padrões de mudanças em enzimas antioxidantes reforçam a relevância de diferentes modelos experimentais de intoxicação por EAA nos efeitos

biológicos dos tecidos e destacam a vulnerabilidade específica dos tecidos, como observado nas glândulas submandibulares de ratos tratados, onde a redução da GPx pode sinalizar o início do esgotamento antioxidante enzimático, apesar das atividades mais altas de SOD e CAT. A GPx é a enzima responsável por manter baixas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto sua atividade tende a diminuir com o aumento das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Panday; Talreja; Kavdia, 2020; Pannala *et al.*, 2014), o que é consistente com o aumento na capacidade oxidante total na glândula submandibular. Este resultado provavelmente está relacionado à maior expressão e padrão de distribuição de receptores de andrógenos nas glândulas submandibulares de ratos (Li *et al.*, 2005; Manzato *et al.*, 2021; Zhuang *et al.*, 1996), tornando-as mais sensíveis à dose supra fisiológica de CT em comparação com as glândulas parótidas. Um resultado semelhante ao da glândula submandibular foi encontrado no fígado e rins de ratos tratados com undecilenato de boldenona, onde a redução da GPx foi associada a mudanças funcionais nesses órgãos (Behairy *et al.*, 2021). Por outro lado, o dano hepático em ratos foi relacionado ao aumento das atividades de SOD, CAT e GPx após o tratamento com dose supra fisiológica de uma combinação de testosterona sintética (Arazi; Rahmati; Ghafoori, 2017) e estanozolol (Pey *et al.*, 2003), enquanto o comprometimento renal em ratos foi relacionado à redução da atividade de SOD e CAT após uma dose semanal de decanoato de nandrolona (Salem; Alnahdi, 2020). Finalmente, os achados fortalecem a hipótese de que o aumento na defesa antioxidante nas glândulas salivares após o tratamento com CT não foi suficiente para proteger as glândulas salivares da disfunção caracterizada pela composição bioquímica da saliva comprometida em ratos.

Apesar dos achados mencionados, o estudo apresenta algumas limitações: 1. O presente estudo explorou uma dose supra fisiológica de apenas um tipo de EAA em animais jovens e sedentários; o uso de esteroides com função predominantemente anabólica pode fornecer resultados diferentes; 2. O modelo experimental empregado pode não gerar os mesmos efeitos em animais adultos, idosos ou fêmeas; 3. Os achados podem diferir em animais submetidos a treinamento físico ou que recebem outras doses e formulações farmacêuticas de EAA; 4. O uso combinado de esteroides anabolizantes e por períodos mais longos também pode fornecer resultados diferentes. Portanto, pesquisas futuras são necessárias para validar os efeitos da dose supra fisiológica de EAA na saúde oral e sistêmica dos usuários.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados indicam que a dose supra fisiológica de cipionato de testosterona é um fator de risco para a saúde oral e sistêmica dos usuários por promover distúrbios na composição da saliva, alterações histomorfométricas, ativação de vias de proliferação celular na glândula submandibular e dano oxidativo em ambas as glândulas salivares.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA-ASLAN, R. *et al.* Necrotizing sialometaplasia of the palate in a young bodybuilder with anabolic androgenic steroids abuse. **Quintessence Int.**, v. 51, n. 6, p. 496-501, 2020.
- ABRAHIN, O. S. C. *et al.* Prevalência do uso e conhecimento de esteroides anabolizantes androgênicos por estudantes e professores de educação física que atuam em academias de ginástica. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 19, n. 1, p. 27-30, fev. 2013.
- ABRAHIN, O. S.; SOUSA, E. C.; SANTOS, A. M. Prevalence of the use of anabolic-androgenic steroids in Brazil: a systematic review. **Subst. Use Misuse**, v. 49, n. 9, p. 1156-1162, Apr. 2014.
- ADTHAPANYAWANICH, K. *et al.* Morphology and gene expression profile of the submandibular gland of androgenreceptor-deficient mice. **Arch. Oral Biol.**, 60, n. 2, p. 320-332, Feb. 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v.105, p. 121-126, 1984.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Hipogonadismo masculino**. 2016. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33884/412285/Boletim+Sa%C3%BAde+e+Economia+n%C2%BA+12/204c4a17-6400-46c9-ae73-95338059ac04>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- ALVES, F. A. *et al.* PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, n. 6, p. 593-597, 2004.
- AMANO, O. *et al.* Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: overview of the Japan salivary gland society sponsored workshop. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 31; n. 45, p. 241-250, Oct. 2012.
- ARAZI, H.; MOHAMMADJAFARI, H.; ASADI, A. Use of anabolic androgenic steroids produces greater oxidative stress responses to resistance exercise in strength-trained men. **Toxicol. Rep.**, v. 4, p. 282-286, Jun. 2017.
- ARAZI, H.; RAHMATI, S.; GHAFORI, H. The interaction effects of resistance training and sustanon abuse on liver antioxidant activities and serum enzymes in male rats. **Interv. Med. Appl Sci.**, v. 9, n. 3, p. 178-183, Sep. 2017.
- ARREGGER, A. L. *et al.* Salivary testosterone: a reliable approach to the diagnosis of male hypogonadism. **Clin. Endocrinol.**, v. 67, n. 5, p. 656-662, Jun. 2007.
- BEHAIRY, A. *et al.* Boldenone undecylenate-mediated hepatorenal impairment by oxidative damage and dysregulation of heat shock protein 90 and androgen receptors expressions: vitamin c preventive role. **Front. Pharmacol.**, v. 12, p. 651497, Apr. 2021.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 15, n. 239, p. 70-76, Jul. 1996.

- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-888, May 1963.
- BHATTARAI, K. R.; KIM, H. R.; CHAE, H. J. Compliance with saliva collection protocol in healthy volunteers: strategies for managing risk and errors. **Int. J. Med. Sci.**, v. 22, n. 15, p. 823-831, May 2018.
- BI, Y. *et al.* Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of depot testosterone cypionate in healthy male subjects. **CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.**, v. 7, n. 4, p. 259-268, Apr. 2018.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BUENO, A. *et al.* A comparative study of the effect of the dose and exposure duration of anabolic androgenic steroids on behavior, cholinergic regulation, and oxidative stress in rats. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0177623, Jun. 2017.
- BURLAGE, F. R. *et al.* Parotid and submandibular/sublingual salivary flow during high dose radiotherapy. **Radiother. Oncol.**, v. 61, n. 3, p. 271-274, Dec. 2001.
- BUSCH, L.; BORDA, E. Castration decreases amylase release associated with muscarinic acetylcholine receptor downregulation in rat parotid gland. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, n. 2, p. 399-407, May. 2003.
- BUSCH, L.; BORDA, E. Influence of castration on isoprenaline-induced amylase release in parotid gland from male rats. **Exp. Physiol.**, v. 87, n. 4, p. 447-452, Jul. 2002.
- CAMPOS, S. C. *et al.* Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 7, p. 661-668, Jul. 2005.
- CARVALHO, F. B. *et al.* Impacts of dose and length of exposure to boldenone and stanozolol on enzymatic antioxidant systems, myeloperoxidase and NAGase activities, and glycogen and lactate levels in rat liver. **Steroids**, v. 161, p. 108670, Sep. 2020.
- CHAINY, G. B. N.; SAHOO, D. K. Hormones and oxidative stress: an overview. **Free Radic. Res.**, v. 54, n. 1, p. 1-26, Jan. 2020.
- CHAWHUAWEANG, D. D. *et al.* Acquired salivary pellicle and oral diseases: a literature review. **J. Dent. Sci.**, v. 16, n. 1, p. 523-529, Jan. 2021.
- CHIGNALIA, A. Z. *et al.* Testosterone induces leucocyte migration by NADPH oxidase-driven ROS- and COX2-dependent mechanisms. **Clin. Sci.**, v. 129, n. 1, p. 39-48, Jul. 2015.
- CHIGNALIA, A. Z. *et al.* Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-*Src*-dependent pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1263-1271, Jun. 2012

CHIMENTO, A. *et al.* Nandrolone and stanozolol induce Leydig cell tumor proliferation through an estrogen-dependent mechanism involving IGF-I system. **J. Cell. Physiol.**, v. 227, n. 5, p. 2079-2088, May. 2012.

CYPRIANO, M. L. *et al.* Effect of testosterone replacement therapy and mate tea (*Ilex paraguariensis*) on biochemical, functional and redox parameters of saliva in orchietomized rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 132, p. 105289. Dec. 2021.

DEVLIN, C. M.; SIMMS, M. S.; MAITLAND, N. J. Benign prostatic hyperplasia - what do we know? **BJU Int.**, v. 127, n. 4, p. 389-399, Apr. 2021.

DINIZ, Y. S. *et al.* Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 749-755, Jun. 2005.

DORNELLES, G. L. *et al.* Biochemical and oxidative stress markers in the liver and kidneys of rats submitted to different protocols of anabolic steroids. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 425, n. 1-2, p. 181-189, Jan. 2017.

EMER, E. *et al.* High-dose testosterone and dehydroepiandrosterone induce cardiotoxicity in rats: Assessment of echocardiographic, morphologic, and oxidative stress parameters. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 35, n. 5, p. 562-572, May, 2016.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clin. Biochem.**, v. 38, n. 12, p. 1103-1111, Dec. 2005.

ESPOSITO, M. *et al.* Impact of anabolic androgenic steroids on male sexual and reproductive function: a systematic review. **Panminerva Med.**, v. 65, n. 1, p. 43-50, Mar. 2023.

FEATHERSTONE, J. D. The science and practice of caries prevention. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 131, n. 7, p. 887-899, Jul. 2000.

FIAIS, G. A. *et al.* Assessment of the toxic effects of levetiracetam on biochemical, functional, and redox parameters of salivary glands in male wistar rats. **Toxicology**, v. 496, p. 153615, Sep. 2023.

FOX, P. C. Acquired salivary dysfunction. Drugs and radiation. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 15, n. 842, p.132-137, Apr. 1998.

FRANKENFELD, S. P. *et al.* The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male wistar rats. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e102699, Sep. 2014.

FREITAS, N. C. D. *et al.* O uso de esteroides androgênicos anabolizantes por praticantes de musculação. **South Am. J. Basic Educ. Tech. Technol.**, v. 6, n. 2, p. 335-345, 2019.

FREITAS, R. N. *et al.* Alterations in salivary biochemical composition and redox state disruption induced by the anticonvulsant valproic acid in male rat salivary glands. **Arch. Oral Biol.**, v. 155, p. 105805, Nov. 2023.

GERMANAKIS, I. *et al.* Oxidative stress and myocardial dysfunction in young rabbits after short term anabolic steroids administration. **Food Chem. Toxicol.**, v. 61, p. 101-105, Nov. 2013.

GRESIK, E. W. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. **Microsc. Res. Tech.**, v. 27, n. 1, p. 1-24, Jan. 1994.

GUGGENHEIMER, J.; MOORE, P. A. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, n. 1, p. 61-119, Jan. 2003.

HABIB AGAHI, M. R.; MOSALLANEJAD, Z.; SALEHI, O. R. The effects of resistance training and spirulina on the performance of the antioxidant system with emphasis on mir125b, mir146a and cognitive function in stanazolol-induced neurotoxicity in rats. **Chem. Biol. Interact**, v. 366, p. 110112, Oct. 2022.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.

HEREDIA, F. P. *et al.* Effect of dehydroepiandrosterone on protein and fat digestibility, body protein and muscular composition in high-fat-diet-fed old rats. **Br. J. Nutr.**, v. 97, n. 3, p. 464-470, Mar. 2007.

HIGGINS, S. J.; BURCHELL, J. M.; MAINWARING, W. I. Androgen-dependent synthesis of basic secretory proteins by the rat seminal vesicle. **Biochem J.**, v. 158, n. 2, p. 271-282, Aug. 1976.

HOSOI, K.; NAKAMURA, T.; UEHA, T. Effect of testosterone on the amount of serous-like granules in convoluted tubular cells of mouse submandibular glands. **J. Biochem.**, v. 81, n. 3, p. 739-748, Mar. 1977.

HSU, Y. J. *et al.* Testosterone increases urinary calcium excretion and inhibits expression of renal calcium transport proteins. **Kidney Int.**, v. 77, n. 7, p. 601-608, Apr. 2010.

IBUKI, F. K.; SIMOES, A.; NOGUEIRA, F. N. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. **Cell Biochem. Funct.**, v. 28, n. 6, p. 503-508, Aug. 2010.

IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Body cult and use of anabolic steroids by bodybuilders. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 773-782, Apr. 2009.

JEZEK, D.; BANEK, L.; BANEK, T. Effects of orchietomy on the rat parotid gland: an ultrastructural and stereological study. **Acta Anat.**, v. 155, n. 3, p. 172-183, 1996.

JOKSIMOVIĆ, J. *et al.* Alterations of the oxidative status in rat hippocampus and prodepressant effect of chronic testosterone enanthate administration. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 433, n. 1-2, p. 41-50, Sep. 2017.

KAIHO, M.; NAKAMURA, T.; KUMEGAWA, M. Morphological studies on the synthesis of secretory granules in convoluted tubules of mouse submandibular gland. **Anat. Rec.**, v. 183, n. 3, p. 405-419, Nov. 1975.

- KARBASI, S. *et al.* Effects of testosterone enanthate and resistance training on myocardium in wistar rats; clinical and anatomical pathology. **Andrologia**, v. 50, n. 3, Apr. 2018.
- KEJRIWAL, S. *et al.* Estimation of levels of salivary mucin, amylase and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patients. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 10, p. ZC56-ZC60, Oct. 2014.
- KHALIL, R. *et al.* Androgen action on renal calcium and phosphate handling: Effects of bisphosphonate treatment and low calcium diet. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 514, p. 110891, Aug. 2020.
- KHAN-DAWOOD, F. S.; CHOE, J. K.; DAWOOD, M. Y. Salivary and plasma bound and "free" testosterone in men and women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 148, n. 4, p. 441-445, Feb. 1984.
- KIM, J. Y.; WOOD, R. I. Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats. **Horm. Behav.**, v. 66, n. 4, p. 585-590, Sep. 2014.
- LASISI, T. J. *et al.* Paradoxical sleep deprivation induces oxidative stress in the submandibular glands of Wistar rats. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 33, n. 4, p. 399-408 Apr. 2021.
- LI, H. J. *et al.* Localization and potential function of androgen receptor in rat salivary gland. **Asian J. Androl.**, v. 7, n. 3, p. 295-301, Sep. 2005.
- LINDBLOM, J. *et al.* Anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate reduces hypothalamic proopiomelanocortin mRNA levels. **Brain Res.**, v. 986, n. 1-2, p. 139-147, Oct. 2003.
- LLENA-PUY, C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 11, n. 5, p. E449-E455, Aug. 2006.
- LUTHER, P. M. *et al.* Testosterone replacement therapy: clinical considerations. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 25, n. 1, p. 25-35, Jan. 2024.
- MADERSBACHER, S.; SAMPSON, N.; CULIG, Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement: a mini-review. **Gerontology**, v. 65, n. 5, p. 458-464, Apr. 2019.
- MAGALHÃES, S. C. *et al.* High-dose nandrolone decanoate induces oxidative stress and inflammation in retroperitoneal adipose tissue of male rats. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 203, p. 105728, Oct. 2020.
- MAHAJAN, S. *et al.* Assessment of salivary gland function after <sup>177</sup>Lu-PSMA radioligand therapy: current concepts in imaging and management. **Transl. Oncol.**, v. 3, n. 21, p. 101445, May 2022.

MANZATO, M. C. *et al.* Cimetidine-induced androgenic failure causes cell death and changes in actin, EGF and V-ATPase immunoeexpression in rat submandibular glands. **J. Anat.**, v. 239, n. 1, p. 136-150, Jul. 2021.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.**, v. 47, n. 3, p. 469-474, Sep. 1974.

MEMUDU, A. E.; DONGO, G. A. A study to demonstrate the potential of Anabolic Androgen Steroid to activate oxidative tissue damage, nephrotoxicity and decline endogenous antioxidant system in renal tissue of Adult Wistar Rats. **Toxicol. Rep.**, v. 10, p. 320-326, Feb. 2023.

MESQUITA, C. S. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Anal. Biochem.**, v. 458, p. 69-71, Aug. 2014.

MIYAJI, Y.; AIYAMA, S.; KURABUCHI, S. Strain-specific and endocrine control of granular convoluted tubule cells and epidermal growth factor expression in the mouse submandibular gland. **Anat. Rec.**, v. 291, n. 1, p. 105-113, Jan. 2008.

MORA, G. R., PRINS, G. S; MAHESH, V. B. Autoregulation of androgen receptor protein and messenger RNA in rat ventral prostate is protein synthesis dependent. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 58, n. 5-6, p. 539-549, Aug. 1996.

NAGY, A. *et al.* Changes of salivary amylase in serum and parotid gland during pharmacological and physiological stimulation. **J. Physiol. Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 141-145, Jan. 2001.

NARITA, T. *et al.* Pilocarpine induces the residual secretion of salivary fluid in perfused submandibular glands of rats. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221832, Aug. 2019.

NEMOTO, T. *et al.* Characterization of nontransformed and transformed androgen receptor from rat submandibular gland. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 839, n. 3, p. 249-257, May 1985.

NEVES, V. G. R. *et al.* Prevalência do uso de anabolizantes pelo esportista amador: o perfil dos usuários e os efeitos colaterais. **Rev. Bras. Interdiscip. Saúde**, v. 3, n. 2, p. 43-47, 2021.

NICHOLSON, T. M.; RICKE, W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. **Differentiation**, v.82, n. 4-5, p. 184-199, May. 2011.

NIEDFELDT, M. W. Anabolic steroid effect on the liver. **Curr. Sports Med. Rep.**, v. 17, n. 3, p. 97-102, Mar. 2018.

NOGUEIRA, F. N *et al.* Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin. Chim. Acta**, v. 353, p. 133-139, Mar. 2005.

NOGUEIRA, F. R *et al.* Anabolic-androgenic steroid use among Brazilian bodybuilders. **Subst. Use Misuse**, v. 49, n. 9, p. 1138-1145, Jul. 2014.

- NUNEZ, A. A. Dose-dependent effects of testosterone on feeding and body weight in male rats. **Behav. Neural. Biol.**, v. 34, n. 4, p. 445-449, Apr. 1982.
- OLATUNJI, L. A.; AREOLA, E. D.; BADMUS, O. O. Endoglin inhibition by sodium acetate and flutamide ameliorates cardiac defective G6PD-dependent antioxidant defense in gestational testosterone-exposed rats. **Biomed. Pharmacother.**, v. 107, p. 1641-1647, Nov. 2018.
- OLIVEIRA, A. C. F. *et al.* Analysis of salivary flow rate, biochemical composition, and redox status in orchietomized spontaneously hypertensive rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 152, p. 105732, Aug. 2023.
- OLIVEIRA, L. L.; CAVALCANTE NETO, J. L. Fatores sociodemográficos, perfil dos usuários e motivação para o uso de esteroides anabolizantes entre jovens adultos. **Rev. Bras. Ciênc. Esporte**, v. 40, n. 3, p. 309-317, jul. 2018.
- ONOPIUK, B. *et al.* Effect of metronidazole on the oxidoreductive processes in the submandibular and parotid glands in experimental research. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2018, p. 7083486, Oct. 2018.
- PANDAY, S.; TALREJA, R.; KAVDIA, M. The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. **Microvasc. Res.**, v. 131, p. 104010, Sep. 2020.
- PANNALA, V. R. *et al.* A mechanistic mathematical model for the catalytic action of glutathione peroxidase. **Free Radic. Res.**, v. 48, n. 4, p. 487-502, Apr. 2014.
- PAPAMITSOU, T. *et al.* Testosterone-induced hypertrophy, fibrosis and apoptosis of cardiac cells--an ultrastructural and immunohistochemical study. **Med. Sci. Monit.** v. 17, n. 9, p. BR266-BR273, Sep. 2011.
- PEDERSEN, A. M. L. *et al.* Salivary secretion in health and disease. **J. Oral Rehabil.**, v. 45, n. 9, p. 730-746, Sep. 2018.
- PERGOLA, G. The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, sup. 2, p. S59-S63, Jun. 2000.
- PETERSSON, S. J. *et al.* Effect of testosterone on markers of mitochondrial oxidative phosphorylation and lipid metabolism in muscle of aging men with subnormal bioavailable testosterone. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 171, n. 1, p. 77-88, Jul. 2014.
- PEY, A. *et al.* Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 87, n. 4-5, p. 269-277, Dec. 2003.
- PIROMPOL, P. *et al.* Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy. **J. Endocrinol.**, v. 229, n. 1, p. 13-23, Feb. 2016.
- PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. **Periodontol.** 2000, v. 70, n. 1, p. 11-25, Feb. 2016.

- PROCTOR, G. B.; SHAALAN, A. M. Disease-Induced Changes in Salivary Gland Function and the Composition of Saliva. **J. Dent. Res.** v. 100, n. 11, p. 1201-1209, Oct. 2021.
- PUTTABYATAPPA, Y. *et al.* Peroxynitrite mediates testosterone-induced vasodilation of microvascular resistance vessels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 345, n. 1, p. 7-14, Apr. 2013.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.
- RILLING, J. K. *et al.* Ratios of plasma and salivary testosterone throughout puberty: production versus bioavailability. **Steroids**, v. 61, n. 6, p. 374-378, Jun. 1996.
- ROMAN, M. *et al.* Computational assessment of pharmacokinetics and biological effects of some anabolic and androgen steroids. **Pharm. Res.**, v. 35, n. 2, p. 41, Feb. 2018.
- ROUSSA, E. Channels and transporters in salivary glands. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 2, p. 263-287, Feb. 2011.
- SADDICK, S. Y. Effect of nandrolone decanoate induced-oxidative stress on rat testes, prostate, and seminal vesicle: biochemical, morphometric and histopathological studies. **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 28, n.1, p. 196-203, Jan. 2021.
- SADOWSKA-KREPA, E. *et al.* High-dose testosterone enanthate supplementation boosts oxidative stress but exerts little effect on the antioxidant barrier in sedentary adolescent male rat liver. **Pharmacol. Rep.**, v. 69, n. 4, p. 673-678, Aug. 2017.
- SADOWSKA-KREPA, E. *et al.* High-dose testosterone supplementation disturbs liver pro-oxidant/antioxidant balance and function in adolescent male wistar rats undergoing moderate-intensity endurance training. **Peer J.**, v. 8, p. e10228, Nov. 2020.
- SAGOE, D. *et al.* The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Ann. Epidemiol.**, v. 2, n. 5, p. 383-398, May 2014.
- SALEM, N. A.; ALNAHDI, H. S. The impact of nandrolone decanoate abuse on experimental animal model: hormonal and biochemical assessment. **Steroids**, v. 153, p. 108526, Jan. 2020.
- SANTOS, D. R. *et al.* Effects of orchietomy and testosterone replacement therapy on redox balance and salivary gland function in Wistar rats. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 218, p. 106048, Apr. 2022.
- SANTOS, J. D. B. *et al.* Food-drug interaction: anabolic steroids aggravate hepatic lipotoxicity and nonalcoholic fatty liver disease induced by trans fatty acids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 116, pt B, p. 360-368, Jun. 2018.
- SELAKOVIC, D. *et al.* The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-enanthate (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test - indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for ex. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 37, n. 5, p. 383-388, Oct. 2016.

- SELAKOVIC, D. *et al.* The impact of hippocampal sex hormones receptors in modulation of depressive-like behavior following chronic anabolic androgenic steroids and exercise protocols in rats. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 13, p. 19, Feb. 2019.
- SEZER, K. *et al.* Assessment of oxidative stress, trace elements, serum biochemistry, and hormones levels in weaned calves with dermatophytosis. **J. Hell. Vet. Med. Soc.**, v. 72, n. 1, p. 2653-2660, Jan.-Mar. 2021.
- SHAHRAKI, M. R.; MIRSHEKARI, H; SHAHRAKI, A. R. Chronic administration of high doses of nandrolone decanoate on the pituitary-gonadal axis in male rats. **Int. J. High Risk Behav. Addict**, v. 4, n. 3, p. e24419, Sep. 2015.
- SHAILA, M.; PAI, G. P.; SHETTY, P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: a comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 17, n. 1, p. 42-46, Jan.-Feb. 2013.
- SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 39, n. 3, p. 327-333, set. 2003.
- SILVA, P. R. P. *et al.* Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**, v. 51, n. 1, p. 104-110, fev. 2007.
- SOUZA, L. D. *et al.* Micronucleus as biomarkers of cancer risk in anabolic androgenic steroids users. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 36, n. 3, p. 302-310, Mar. 2017.
- THULESEN, J. *et al.* Altered secretion and processing of epidermal growth factor in adrenergic-induced growth of the rat submandibular gland. **Regul. Pept.**, v. 106, n. 1-3, p. 105-114, Jun. 2002.
- TOOT, J. *et al.* Testosterone influences renal electrolyte excretion in SHR/y and WKY males. **BMC Physiol.**, v. 8, p. 5, 2008.
- TORRES-BUGARÍN O. *et al.* Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. **Br. J. Sports Med.**, v. 41, n. 9, p. 592-596, Sep. 2007.
- TÓTHOVÁ, L. *et al.* Effect of exogenous testosterone on oxidative status of the testes in adult male rats. **Andrologia**, v. 45, n. 6, p. 417-423, Nov. 2013.
- TRIVEDI, R. C. *et al.* New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. **Clin. Chem.**, v. 24, n. 11, p. 1908-1911, Nov. 1978.
- TULUNOGLU, O.; DEMIRTAS, S.; TULUNOGLU, I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 16, n. 3, p. 186-191, Jun. 2006.
- UNLUHIZARCI, K. *et al.* Treatment of male hypogonadism partially reverses oxidative stress in patients with hypogonadism. **Endocr. J.**, v. 67, n. 9, p. 935-940, Sep. 2020.

USTUNEL, I.; AKKOYUNLU, G.; DEMIR, R. The effect of testosterone on gastrocnemius muscle fibres in growing and adult male and female rats: a histochemical, morphometric and ultrastructural study. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 32, n. 2, p. 70-79, Apr. 2003.

VALENTE-SANTOS, J. *et al.* Long-term exposure to supraphysiological levels of testosterone impacts rat submandibular gland proteome. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 550, Dec. 2023.

VERAS, A. S. C. *et al.* Aerobic physical exercise modifies the prostate tumoral environment. **Life Sci.**, v. 332, p. 122097, Nov. 2023.

VESKOUKIS, A. S. *et al.* Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 33, n. 6, p. 1140-1154, Dec. 2008.

VIEIRA, R. P. *et al.* Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 40, n. 5, p. 842-847, May. 2008.

WADTHAISONG, M. *et al.* Chronic high-dose testosterone treatment: impact on rat cardiac contractile biology. **Physiol. Rep.**, v. 7, n. 14, p. e141, Jul. 2019.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 325-333, 1981.

XU, L. *et al.* Resveratrol attenuates radiation-induced salivary gland dysfunction in mice. **Laryngoscope**, v. 123, n. 11, p. E23-E29, Jun. 2013.

YU-YAHIRO, J. A. *et al.* Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. **Am. J. Sports Med.**, v. 17, n. 5, p. 686-689, Sep-Oct. 1989.

ZALEWSKA, A. *et al.* Antioxidant profile of salivary glands in high fat diet-induced insulin resistance rats. **Oral Dis.**, v. 20, p. 560-566, Sep. 2014.

ZHOU, M. *et al.* Localization of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits in rat submandibular gland. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 58, n. 6, p. 499-507, Jun. 2010.

ZHUANG, Y. H. *et al.* Androgen receptor in rat harderian and submandibular glands. **Histochem. J.**, v. 28, n. 7, p. 477-483, Jul. 1996.

## ANEXOS

### ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Análises histológicas, bioquímicas e do estado redox sobre os efeitos de altas doses de cipionato de testosterona nas glândulas salivares de ratos machos Wistar”**, Processo FOA nº 0373-2022, sob responsabilidade de Antonio Hernandes Chaves Neto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Maio de 2022.

**VALIDADE DESTES CERTIFICADO:** 31 de Dezembro de 2025.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 31 de Janeiro de 2026.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Histological, biochemical and redox status analyzes on the effects of high doses of testosterone cypionate on the salivary glands of male Wistar rats”**, Protocol FOA nº 0373-2022, under the supervision of Antonio Hernandes Chaves Neto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 30, 2022.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** December 31, 2025.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** January 31, 2026.

**Prof. Dr. João Carlos Callera**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

# ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO (EFFECTS OF A SUPRAPHYSIOLOGICAL DOSE OF TESTOSTERONE CYPIONATE ON SALIVARY GLAND FUNCTION IN ADULT MALE WISTAR RATS)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jsbmb](http://www.elsevier.com/locate/jsbmb)



## Effects of a supraphysiological dose of testosterone cypionate on salivary gland function in adult male Wistar rats

Larissa Victorino Sampaio<sup>a,d</sup>, Heloisa Rodrigues dos Santos Landim<sup>a</sup>, Arieli Raymundo Vazão<sup>a,c</sup>, Gabriela Alice Fiães<sup>a,d</sup>, Rayara Nogueira de Freitas<sup>a,c</sup>, Alice Santos Cruz Veras<sup>b,d</sup>, Rita Cassia Menegatti Dornelles<sup>a,d</sup>, Walid D. Fakhouri<sup>e</sup>, Rafael Rodrigues Lima<sup>f</sup>, Giovana Rampazzo Teixeira<sup>b,d</sup>, Antonio Hernandes Chaves-Neto<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Basic Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil

<sup>b</sup> Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP), School of Technology and Sciences, Presidente Prudente, Brazil

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Sciences, Pediatric Oral Health, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil

<sup>d</sup> Multicentric Postgraduate Program in Physiological Sciences, SBFs, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil

<sup>e</sup> Center for Craniofacial Research, Department of Diagnostic and Biomedical Sciences, School of Dentistry, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, USA

<sup>f</sup> Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para (UFPA), Belém, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Salivary Glands  
Saliva  
Testosterone Cypionate  
Oxidative Stress

### ABSTRACT

The abusive use of anabolic androgenic steroids has become a serious health problem worldwide, but its effects on oral health are still poorly understood. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of a supraphysiological dose of testosterone cypionate (TC) on salivary biochemical, histomorphology, immunohistochemistry, and redox state parameters of parotid and submandibular glands. Twenty male Wistar rats, 12 weeks old, were divided into two groups (n=10/group): a control group and TC group, which received a dose of 20 mg/kg, once a week, for 6 weeks. Post treatment, the saliva and glands were collected. A supraphysiological dose of TC increased plasma and salivary testosterone concentrations. Although TC did not alter salivary flow, pH, and buffering capacity, the treatment increased the salivary secretion of total protein and reduced amylase, calcium, phosphate, and potassium. TC reduced the connective tissue area in the parotid gland and acinar area of the submandibular gland, while increasing the granular convoluted tubule area in the submandibular gland. Proliferating cell nuclear antigen was higher in the acinar cells of the submandibular glands from the TC group. Moreover, TC increased concentrations of total oxidant capacity and damaged lipids in both salivary glands, while total antioxidant activity and uric acid were lower in the submandibular gland, and reduced glutathione was higher in both glands. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities were higher in the parotid gland, while only glutathione peroxidase activity was lower in the submandibular gland of the TC group. In conclusion, TC abuse may be a potential factor for dysfunction of the parotid and submandibular glands, becoming a risk factor for the oral and systemic health of users.

### 1. Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) are a class of natural or synthetic substances produced from testosterone or its derivatives, used for

various therapeutic purposes, especially in hormone replacement therapy in men with hypogonadism [1,2]. However, like other medications, AAS also have side effects, especially when used abusively and non-therapeutically. Athletes, bodybuilders, and gym-goers frequently

Abbreviations: AAS, anabolic androgenic steroid; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CAT, catalase; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GPx, glutathione peroxidase; GR, reduced glutathione; H&E, hematoxylin and eosin; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TC, Testosterone Cypionate.

\* Correspondence to: Department of Basic Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Rodovia Marechal Rondon, km 527/528, Araçatuba, SP CEP 16018-805, Brazil.

E-mail address: [antonio.hernandes@unesp.br](mailto:antonio.hernandes@unesp.br) (A.H. Chaves-Neto).

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2024.106587>

Received 9 June 2024; Received in revised form 11 July 2024; Accepted 12 July 2024

Available online 14 July 2024

0960-0760/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

## ANEXO C – PRÊMIOS E MENÇÕES HONROSAS





# 36° COB

CONGRESSO ODONTOLÓGICO DE BAURU  
Prof. Dr. Estevam Augusto Bonfante



## CERTIFICADO

Certificamos que


O trabalho intitulado "**Esteróide anabolizante androgênico promove alterações bioquímicas e do estado redox da saliva de ratos Wistar**", de autoria de Larissa Victorino Sampaio, Heloisa Rodrigues dos Santos Landim, Arieli Raymundo Vazão, Pedro Penati Pimpinato, Lívia Claudino e Antônio Hernandes, recebeu premiação de **MENÇÃO HONROSA** na Exposição de poster Apresentação Painel - Pesquisa/ Revisão Sistemática (Pós-Graduação), na área temática Ciências Básicas Aplicadas, no evento 36° Congresso Odontológico de Bauru "Prof. Dr. Estevam Augusto Bonfante", realizado nos dias 17, 18, 19 e 20 de maio de 2023, na Faculdade de Odontologia de Bauru.


Bauru, 06 de junho de 2023.

  
Prof. Dra. Ana Cláudia de Castro Ferreira Conti  
Coordenadora Docente

  
Prof. Dra. Ana Flavia Sanches Borges  
Coordenadora Docente

  
Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos  
Coordenador Docente

  
Prof. Dra. Simone Soares  
Coordenadora Docente

  
Prof. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf  
Diretora da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB USP

  
Amanda Moura Ferreira  
Presidente do 36° Congresso Odontológico de Bauru

12°  
CONGRESSO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

12° CONGRESSO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA  
COFOA/UNESP "Prof. Wilson Galhego Garcia"  
42° JORNADA ACADÊMICA "Prof. Osvaldo Magro Filho"  
18° SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO "Profa. Suzely Adas Saliba Moimaz"  
14° ENCONTRO DO CAOE

## Certificado

Certificamos que o trabalho apresentado intitulado *Anabolizante androgênico promove distúrbios no estado redox e redução de amilase e eletrólitos na saliva de ratos Wistar* de autoria de Larissa Victorino Sampaio, Arieli Raymundo Vazão, Gabriela Alice Fiéis, Rayara Nogueira De Freitas, Heloisa Rodrigues dos Santos Landim, Lívia Claudino, Pedro Penati Pimpinato e Antônio Hernandes, recebeu **MENÇÃO HONROSA** no 12° Congresso da Faculdade de Odontologia de Araçatuba COFOA/UNESP, realizado em 24/08/2023 a 26/08/2023, na cidade de Araçatuba - São Paulo.

  
Prof. Tit. Glaucio Issamu Miyahara  
Diretor da FOD/UNESP

  
Araçatuba, 27 de Agosto de 2023  
Prof. Rafael Scaf de Melon  
Presidente do 12° COFOA/UNESP

  
Mayra Fernanda Ferreira  
Secretária Acadêmica da Pós-Graduação

  
Francieli da Silva Flores  
Secretária Acadêmica da Graduação



**47º CONGRESSO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA**



TDV  **CERTIFICADO**

Certificamos que

*Larissa Victorino Sampaio*

recebeu Menção Honrosa no trabalho "ANABOLIZANTE PROMOVE ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERA A COMPOSIÇÃO DA SALIVA DE RATOS WISTAR MACHO", tendo como orientador o Prof.(a) Antônio Hernandes Chaves Neto e coautor(res) Arieli Raymundo Vazão, Gabriela Alice Fiais, Rayara Nogueira de Freitas, Heloisa Rodrigues dos Santos Landim, Lívia Claudino, Pedro Penati Pimpinato, Renan José Barzotti, José Vitor Furuya de Lima na categoria a "Básico" para a banca avaliadora da área "Biomateriais e Biologia Oral" no 47º Congresso Universitário Brasileiro de Odontologia, no dia 25 de setembro de 2023.

São Paulo, 25 de setembro de 2023

*Sabrina G. Avelino*  
Sabrina Gardiano Avelino  
Presidente do 47º CUBO

*Karine Shiguio*  
Karine Harumi Shiguio  
Vice Presidente do 47º CUBO



**CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA**

Atestamos aos devidos fins que:

**Larissa Victorino Sampaio**

Recebeu menção honrosa pelo trabalho intitulado "Alta dose de anabolizante esteroide androgênico aumenta estresse oxidativo e reduz área de estroma nas glândulas parótidas de ratos Wistar" no XII Congresso Odontológico de Araraquara – FOAr/UNESP Profa. Dra. Elaine Massucato (75º JOFOA – Jornada Odontológica da Faculdade de Araraquara e 35º JAFOA – Jornada Acadêmica da Faculdade de Odontologia de Araraquara) no dia 24 de outubro de 2023.

*Josimeri Hebling Costa*  
Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa  
Presidente Docente do Congresso

*Caroline Meronha de Lima*  
Caroline Meronha de Lima  
Presidente Discente do Congresso

*Júlia de Moraes Godoi*  
Júlia de Moraes Godoi  
Vice-Presidente Discente do Congresso

*Elaine Pereira da Silva Tagliaferro*  
Profa. Dra. Elaine Pereira da Silva Tagliaferro  
Vice-Presidente Docente do Congresso






**XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE)**  
 XXII REUNIÃO ANUAL DA BRAZILIAN RESEARCH ASSOCIATION FOR VISION AND OPHTHALMOLOGY (BRAVO)  
 XVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL)  
 XV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOCÊNCIAS NUCLEARES (SBBN)  
 III CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD BRASIL)  
 II CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOACÚSTICA (SBBA)

## CERTIFICADO

### **HIGH DOSE OF ANABOLIC AGENT PROMOTES OXIDATIVE DAMAGE AND HISTOMORPHOMETRIC CHANGES IN MALE WISTAR RATS SUBMANDIBULAR GLANDS**

Larissa Victorino Sampaio, Renan José Barzotti, Rayara Nogueira de Freitas, Guilherme Eduardo Rocha Silva, José Vitor Furuya de Lima e Antonio Hernandes Chaves Neto

Foi agraciado com a menção honrosa na XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), realizada de 2 a 5 de julho de 2024, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na cidade de Campinas/SP

Prof. Dr. Eduardo Colombari  
Presidente da FeSBE



FOMENTO



PATROCÍNIO DIAMANTE



PATROCÍNIO PRATA

