

AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA: Dados preliminares

*(Evaluation of the fertility of wistar rates submitted to chronic treatment
with nandrolone decanoate: preliminary data)*

Solano Dantas MARTINS^{1*}; Fernanda Lima ALVES²; Maria Alice Felipe OLIVEIRA²;
Ana Normélia Pereira de MORAIS²; Yeda Fumie WATANABE³; Vânia
Marilande CECCATTO²; Valdevane Rocha ARAÚJO²

¹Curso de Biomedicina, Centro Universitário Maurício de Nassau, Av. Dr. Silas Munguba,
Fortaleza/CE. CEP: 60.740-020; ²Universidade Estadual do Ceará; ³Vitrogen e
YVF Biotech/SP. *E-mail: solanodantas59@gmail.com

ABSTRACT

The search for the ideal body has been making people appeal increasingly to surgical intervention and medicine which can accelerate the aesthetic transformations that are so desired. Among these medicines, Anabolic-androgenic steroids (AAS) is being used, specially Nandrolone Decanoate (DECA), which has more anabolic than androgenic effects. However, it is not known at which point of the use of AAS can comprise fertility of male users. In this way, the objective of the present study was to evaluate the effects of chronic administration of doses of Nandrolone Decanoate in male Wistar rat fertility. For such a matter was used 20 rats Wistar, which 16 were males and 4 females, adults, with 8 weeks old, weighing 250 to 350g. Males were divided into two groups: Control and DECA group. Based on the data preliminarily obtained, even though observing some macroscopics abnormalities in the testicles of rats treated with DECA, such as testicular atrophy, apparently these steroids do not affect the reproductive male health significantly at the point of comprising the capacity of fertilization.

Key Words: In vitro fertilization, male fertility, spermatogenesis.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade atletas usam plantas ou drogas naturais e sintéticas para obter um melhor desempenho desportivo. Atualmente, os esteróides anabólicos androgênicos (EAA), os quais constituem uma classe de compostos sintéticos com estrutura molecular semelhante à testosterona, têm sido os mais utilizados. Essas drogas têm o objetivo de melhorar os efeitos anabólicos com o aumento de síntese proteica e eram utilizados apenas por atletas profissionais, para melhorar a força muscular e o desempenho. Contudo, sua utilização com propósitos não médicos e entre praticantes de exercícios que buscam mudanças na aparência física, vem aumentando consideravelmente, podendo tornar-se um problema de saúde pública.

Dentre os anabólicos mais utilizados e estudados, destaca-se o decanoato de nandrolona (Decaland Depot – 200g) (SHOKRI *et al.*, 2010; BUSNARDO *et al.*, 2015). Estudos anteriores verificaram que o uso indevido de EAA, tais como a nandrolona acarreta no declínio na produção de testosterona pelo testículo, seguido de um aumento significativo na baixa qualidade das células

espermáticas, espermatogênese reduzida, diminuição da libido e do volume testicular (SHOKRI *et al.*, 2010; NIESCHLAG e VORONA, 2015; MIN e LEE, 2018).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da administração crônica de doses de decanoato de nandrolona na capacidade reprodutiva de ratos *Wistar* através de biotécnicas reprodutivas, como a fertilização *in vitro* (FIV). Segundo Berger *et al.* (2010), a FIV fornece uma avaliação mais sensível para comprovar efeitos adversos na fertilidade masculina.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos animais

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA/UECE), sob protocolo nº 10043823/2019. Para tal foram utilizados 20 ratos *Wistar*, sendo 16 machos e 4 fêmeas, adultos, com 8 semanas de idade, pesando de 250 a 350g provenientes do biotério da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais foram mantidos em temperatura e iluminação controladas (22-24 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas) e, para o experimento foram distribuídos em 2 grupos: Grupo Controle: animais que receberam apenas injeção de veículo. Grupo DECA: animais tratados com 10mg/kg de decanoato de nandrolona.

Tratamento crônico com Decanoato de Nandrolona

Os animais receberam as injeções intramusculares (IM) no membro posterior direito, uma vez por semana, durante 8 semanas e foram eutanasiadas por decapitação após serem anestesiadas com cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg), logo após a nona semana de tratamento. A dose administrada está de acordo com relatos anteriores de sua eficácia, no aumento dos níveis séricos de testosterona (MOHAMED e MOHAMED, 2015). Já o grupo controle recebeu apenas o veículo de administração do medicamento, composto de óleo de amendoim adicionado de 10% de álcool benzoico, de forma semelhante ao grupo DECA.

Protocolo de superovulação e fertilização *in vitro*

Três dias antes do dia previsto para ocorrer a FIV (Dia 3) as fêmeas receberam injeção intraperitoneal de gonadotrofina coriônica equina (eCG) na concentração de 50 UI/kg seguida de uma segunda aplicação 24 horas após a primeira (Dia 2) também de 50 UI/kg de eCG. Após 12 horas da última aplicação da gonadotrofina as fêmeas foram eutanasiadas por decapitação após serem anestesiadas com cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg). Em seguida os ovários e ovidutos foram dissecados. Foram recuperados Complexo Cumulus-Oócitos (CCOs) maturados, ou seja, aqueles com primeiro corpúsculo polar visível e células do cumulus expandidas.

Para a coleta dos espermatozoides, os machos foram eutanasiados por decapitação de maneira semelhante às fêmeas, sendo dissecados os epidídimos. Após serem recuperados, os espermatozoides foram lavados em meio SPERM-TALP (Vitrogen). Para a FIV (Dia 0), os gametas foram co-incubados em meio FIV-TALP acrescido de heparina e PHE (Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina), sob óleo mineral a 37 °C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Após

16 horas, os presumíveis zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV) e avaliados quanto ao grau de clivagem após 48 horas. A troca parcial do meio foi realizada nos dias 2 e 4 de cultivo embrionário, momentos nos quais as taxas de clivagem e produção embrionária (mórula e blastocisto) foram avaliadas. A fertilização *in vitro* ocorreu seguindo o protocolo proposto por TOSHIRO (2011) em ratos.

Análise Estatística

Para a análise estatística, foi feita a confecção de uma tabela na qual foi realizado o cálculo padrão para obtenção da porcentagem de CCOs fertilizados pela seguinte fórmula: N° CCOs clivados / N° CCOs recuperados x100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados expressos na tabela abaixo demonstraram percentuais de clivagem após 48 horas em 9 de 23 (39%) CCOs recuperados no grupo controle. Já em relação ao grupo DECA, a taxa de clivagem foi de 40%, não observando assim diferença significativa entre os grupos.

Tabela 01: Percentual de Complexos Cumulus-Oócitos (CCOs) fertilizados com espermatozoides de animais dos grupos Controle e DECA.

	CCOs Recuperados	Clivados (48hrs)	Blastocistos (48hrs)	% Oócitos fertilizados
CTRL	23	9	0	39
DECA	10	4	0	40

Legenda: Grupo controle (CTRL); Grupo submetido a tratamento com decanoato de nandrolona (DECA).

Sabe-se na literatura que a qualidade dos protocolos de superovulação para o aumento das taxas de recuperação oocitária dependem de fatores como a espécie, tempo e hormônios a serem utilizados, assim como suas respectivas concentrações hormonais (NOORANIZADEH *et al.*, 2018). Um estudo recente de Hino *et al.* (2020), utilizando a associação de 150-300 IU/kg de eCG, seguido 48 horas após a administração de 150-300 IU/kg de gonadotrofina coriônica humana (hCG), verificaram também a influência do maior tempo de eutanásia dos animais e recuperação oocitária a partir do oviduto. Estes aspectos explicariam o baixo número de CCOs maduros obtidos previamente para realizar a fertilização *in vitro* em nosso estudo.

Apesar de tais resultados não terem gerado diferença significativa na produção de mórula e blastocisto, outras condições foram observadas em nossos achados como a atrofia testicular. NIESCHLAG e VORONA (2015) e SALERMO *et al.* (2018) demonstram resultados semelhantes,

relacionados às anormalidades na motilidade e morfologia espermáticas na utilização de anabolizantes androgênicos (DOHLE et al. 2003; AHAMED, 2004; MOHAMED e MOHAMED, 2014), embora estes parâmetros apresentem uma correlação limitada com a fertilidade (DANIS e SAMPLASKI, 2019).

Portanto, com base nos dados preliminares obtidos, mesmo observando algumas alterações macroscópicas nos testículos dos ratos tratados com DECA, aparentemente este esteroide não gera danos significativos à saúde reprodutiva dos machos ao ponto de afetar a funcionalidade do espermatozoide na fertilização. Além disso, torna-se necessário adaptar o protocolo de superovulação na tentativa de ampliar a recuperação oocitária, realizando por seguinte novos experimentos de FIV para o melhor entendimento do efeito da administração do DECA nestes animais sobre a produção embrionária.

CONCLUSÕES

Portanto, com base nos dados preliminares obtidos, apesar das alterações macroscópicas nos testículos dos ratos tratados com DECA, este esteroide não gerou alterações nas taxas de clivagem e formação de blastocistos, indicando não alterar a fertilidade dos animais tratados. Além disso, torna-se necessário adaptar o protocolo de superovulação na tentativa de ampliar a recuperação oocitária. Novos experimentos então, se fazem necessários para um melhor entendimento do efeito da administração do DECA sobre o potencial fecundante destes animais.

REFERÊNCIAS

- BARBARESTANI, M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.106, n.4, p.324-330. 2010.
- BERGER, T.; MILLER, M.G.; HORNER, C.M.; In vitro fertilization after in vivo treatment of rats with three reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, v.14, n.9, p.45-53, 2000.
- BUSARDÒ, F.P.; FRATI, P.; SANZO, M.D.; NAPOLETANO, S.; PINCHI, E.; ZAAMI, S.; FINESCHI, V. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, v.13, n.1, p.122-131, 2015.
- DANIS, R.B.; SAMPLASKI, M.K. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports*, v.20, n.8, p.43-53, 2019.
- DOHLE GR, SMIT M, WEBER RF. Androgens and male fertility. *World Journal of Urology*, v.21, n.5, p.341-345, 2003.
- HINO, C.; UEDA, J.; FUNAKOSHI, H.; MATSUMOTO, S. Defined oocyte collection time is critical for reproducible in vitro fertilization in rats of different strains. *Theriogenology*, v.144, n.6, p.146-141, 2020.

MIN, T.; LEE, K.H.; Effects of nandrolone decanoate on expression of steroidogenic enzymes in the rat testis. *Asian-Australas. Journal of Animal Science*, v.31, n.5, p.658-671, 2018.

NIESCHLAG, E.; VORONA, E.; Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): adverse effects on non-reproductive organs and functions. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v.16, n.4, p.199-211, 2015.

SHOKRI, S.; AITKEN, R.J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI, F.M.; KASHANI, I.; EJTEMAEIMEHR, S.; AHMADIAN, S.; MINAEI, B.; NARAGHI, M.A.; BARBARESTANI, M.; Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.106, n.4, p.324-330, 2010.

SALERNO, M.; CASCIO, O.; BERTOZZI, G.; SESSA, F.; MESSINA, A.; MONDA, V.; CIPOLLONI, L.; BIONDI, A.; DANIELE, A.; POMARA, C. Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review. *Oncotarget*, v.9, n.27, p. 19415–19426, 2018.