



**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO USO ISOLADO DE METILTESTOSTERONA SOBRE OS REFLEXOS
CARDIOVASCULARES E SEGURANÇA GENO E CITOTÓXICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

DENISE GALVÊAS TERRA

**VILA VELHA
JUNHO DE 2012**



**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DO USO ISOLADO DE METILTESTOSTERONA SOBRE OS REFLEXOS
CARDIOVASCULARES E SEGURANÇA GENO E CITOTÓXICA EM RATAS
OVARIETOMIZADAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

DENISE GALVÊAS TERRA

**Orientador:
Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade**

**VILA VELHA
JUNHO DE 2012**

Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO USO ISOLADO DE METILTESTOSTERONA SOBRE OS REFLEXOS
CARDIOVASCULARES E SEGURANÇA GENO E CITOTÓXICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

DENISE GALVÊAS TERRA

Aprovada em 22 de Junho de 2012,

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sonia Alves Gôuvea - UFES

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV

**Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade – UVV
(Orientador)**

Aos meus pais, José Clélio e Zéa, que são
minha referência de ética e responsabilidade
e aos meus filhos, Isabela e Rodrigo, amores
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à luz que recebo e acolho da espiritualidade amiga.

Aos meus maravilhosos pais Zéa e José Clélio, pela formação pessoal e profissional que me deram e por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, com amor e apoio incondicionais.

Aos meus muito amados filhos, Isabela e Rodrigo, que por vezes se privaram da minha companhia para que eu concluísse esta importante etapa da minha vida profissional e que participaram com muito carinho da parte experimental do meu trabalho.

Aos meus irmãos e cunhadas, pelo apoio constante em minha vida.

Ao professor e orientador Tadeu Uggere de Andrade pela oportunidade, confiança, exemplo e amizade.

À professora Nazaré Souza Bissoli e doutoranda Poliana (UFES), que abriram as portas na UFES para que eu pudesse aprofundar meu aprendizado técnico e realizar os procedimentos que foram necessários.

À professora Ieda, que me ajudou na realização da pesquisa de micronúcleo.

Ao colega médico patologista Rogério Piontkovski que realizou os exames histopatológicos deste trabalho com tanta gentileza e boa vontade.

Aos colegas de mestrado e amigos Andrews, Ewelyne, Silas e Girlândia pelo enorme apoio, trabalho em equipe, amizade e prazeroso convívio.

A mestranda Karla Cassaro, que entrou muito bem vinda em minha vida em tão oportuno momento deste trabalho, apoiando-me no que fosse necessário.

Às funcionárias Cláudia e Juliana por serem tão prestativas comigo e zelosas com os animais.

A todos que não citei e que participaram direta e indiretamente deste trabalho.

RESUMO

OBJETIVOS: Investigar possíveis efeitos da reposição isolada de metiltestosterona em ratas castradas e em ratas naturalmente estrogeneizadas sobre o barorreflexo, sobre o reflexo de Bezold-Jarisch, sobre o coração, fígado, rins e útero e, ainda, investigar a cito e genotoxicidade do fármaco. **MÉTODOS:** Foram separadas 24 ratas wistar com 12 semanas de vida e divididas em quatro grupos: O primeiro (OVX + MT) foi submetido à ovariectomia e fez uso de metiltestosterona; o segundo (OVX) foi submetido à castração cirúrgica e fez uso de veículo; o terceiro (SHAM + MT) foi submetido a cirurgia fectícia e fez uso metiltestosterona e o quarto grupo (SHAM) foi submetido a cirurgia fictícia e fez uso de veículo. A metiltestosterona (na dose de 0,04 mg/dia) e o veículo foram administrados por 28 dias. Os quatro grupos foram avaliados em relação à pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais, à resposta barorreflexa e ao reflexo de Bezold-Jarisch após o 28º dia de tratamento e, em seguida, foram eutanasiados. O barorreflexo foi avaliado por meio da administração de doses randomizadas de fenilefrina (FENIL 0,5-8,0 µg/Kg) e nitroprussiato de sódio (NPS 1,0-16,0 µg/Kg). O reflexo de Bezod-Jarisch (RBJ) foi ativado quimicamente pela injeção intravenosa de doses rabdomizadas de fenilbiguanida (1,5-24,0 µg/Kg) e identificado por reduções dose-dependentes da FC e pressão arterial diastólica (PAD), simultaneamente, e avaliado através do valor relativo máximo de queda da FC e PAD após cada dose da fenilbiguanida. O peso corporal úmido das ratas foi avaliado antes e depois do tratamento. À necropsia realizou-se a retirada de coração, fígado, rins e útero para avaliação ponderal e exame histopatológico. O efeito mutagênico e citotóxico foi realizado empregando-se ensaio do micronúcleo em células da medula de fêmures de ratas pertencentes aos grupos controle negativo (uso de veículo), controle positivo (uso de ciclofosfamida) e o grupo que usou a metiltestosterona (MT). **RESULTADOS:** Não houve variação da PAM (SHAM: 106±2 mmHg; SHAM+MT: 107±3 mmHg; OVX: 106±7 mmHg; OVX+MT: 107±3 mmHg) e FC (SHAM: 339±13 bpm; SHAM+MT: 318±13 bpm; OVX: 340±15 bpm; OVX+MT: 337±9 bpm) basais, nem do RBJ com a castração ou com o uso de MT. O barorreflexo foi prejudicado nas ratas castradas ($BRS_{PE} = -1,611 \pm 0,110 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $BRS_{NP} = -2,727 \pm 0,232 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) e voltou aos padrões normais no grupo das ratas castradas que receberam o tratamento com a metiltestosterona ($BRS_{PE} = -2,356 \pm 0,199 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $BRS_{NP} = -3,824 \pm 0,255 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$). Em relação à avaliação ponderal e a avaliação histopatológica foi identificada hipotrofia dos úteros de todas as ratas que foram submetidas a castração. Quanto às outras

vísceras, não houve diferença em relação ao peso da víscera/peso da rata e nem alterações microscópicas ao exame histopatológico. As ratas ovariectomizadas apresentaram aumento de ganho de peso ($\Delta P=81,3\pm 9g$; $p<0,01$), o que foi prevenido pelo tratamento com MT. A dose de 0,04 mg/kg de MT utilizada não provocou aumento no número de eritrócitos policromáticos micronucleados, nem da relação eritrócitos policromáticos / eritrócitos normocromáticos em relação ao controle negativo, e foram significativamente menores que os valores do controle positivo. **CONCLUSÃO:** O uso da MT determinou melhoria da função baroreflexa em ratas castradas e prevenção do aumento de ganho de peso. Também foi evidenciado que a MT, na dose utilizada, foi segura para fígado, rins e coração, além de ausência de efeito citotóxico e mutagênico em células de medula óssea.

Palavras-chaves: metiltestosterona, barorreflexo, reflexo de Bezold-Jarisch, hepatotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, ensaio do micronúcleo.

ABSTRACT

Effect of single use of methyltestosterone on cardiovascular reflexes and safety genotoxic and cytotoxic in ovariectomized rats. OBJECTIVES: To investigate possible effects of isolated parts of methyltestosterone in rats and in castrated rats estrogenized course on the baroreflex on the Bezold-Jarisch reflex on the heart, liver, kidneys and uterus, and also investigate the quote and the drug genotoxicidade. **METHODS:** 24 Wistar rats were separated with 12 weeks of age and divided into four groups: The first (OVX + MT) underwent ovariectomy and made use of methyltestosterone, the second (OVX) underwent surgical castration and made use of vehicle, the third (MT + sHAM) underwent surgery and made use of methyltestosterone and the fourth group (sHAM) underwent sham surgery and made use of the vehicle. The methyltestosterone (at a dose of 0.04 mg / day) and the vehicle were administered for 28 days. The four groups were assessed for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) levels, the baroreflex response and the Bezold-Jarisch reflex after 28 days of treatment and then were euthanized. The baroreflex was evaluated by randomized doses of phenylephrine (PHENYL 0.5 to 8.0 mg / kg) and sodium nitroprusside (SNP 1.0 to 16.0 mg / kg). The Bezold-Jarisch reflex (BJR) was chemically activated by intravenous injection of doses of randomized fenilbiguanida (1.5 to 24.0 mg / kg) and identified by dose-dependent reductions in heart rate and diastolic blood pressure (DBP), while and measured by

the value of maximum fall of DBP and HR after each dose of fenilbiguanida. The wet weight of the rats was measured before and after treatment. At necropsy there was the removal of the heart, liver, kidneys and uterus to assess weight and histopathological examination. The cytotoxic and mutagenic effect was carried out employing the micronucleus test in bone marrow cells of femurs of rats in the groups negative control (vehicle use), positive control (cyclophosphamide use) and the group that used the methyltestosterone (MT). **RESULTS:** There was no change in MAP (SHAM: 106 ± 2 mmHg; MT + SHAM: 107 ± 3 mmHg; OVX: 106 ± 7 mmHg; OVX + TM: 107 ± 3 mmHg) and HR (SHAM: 339 ± 13 bpm; SHAM + MT: 318 ± 13 bpm; OVX: 340 ± 15 bpm; OVX + TM: 337 ± 9 bpm) at baseline, or the RBJ with castration or the use of MT. The baroreflex was impaired in castrated rats (BRSPE = -1.611 ± 0.110 bpm-1.mmHg-1; BRSNP = -2.727 ± 0.232 bpm-1.mmHg-1) and returned to normal in the group of castrated rats that received treatment to methyltestosterone (BRSPE = -2.356 ± 0.199 1.mmHg-1-bpm; BRSNP = -3.824 ± 0.255 bpm-1.mmHg-1). Regarding the assessment of weight and histopathological evaluation was identified atrophy of uteri of all rats that were submetidas castration. The other viscera, there was no difference in the weight of the viscera / weight of the rat nor alterações microscopic histopathological examination. The ovariectomized rats increased weight gain (DP = 81.3 ± 9 g, $p < 0.01$), which was prevented by treatment with MT. The dose of 0.04 mg / kg of TM used is not increased the number of micronucleated polychromatic erythrocytes or red blood cell ratio plocromáticos / normochromatic erythrocytes relative to the negative control and was significantly lower than the positive control values. **CONCLUSION:** The use of TM determined baroreflex function improvement in castrated rats and prevention of increase in weight gain. It was also shown that the MT at the dose used was safe for the liver, kidneys and heart, and absence of cytotoxic and mutagenic effects on bone marrow cells.

Keywords: methyltestosterone, baroreflex, Bezold-Jarisch reflex, hepatotoxicity, genotoxicity.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1.1 Fisiologia da produção hormonal feminina	12
1.1.2 Modulação hormonal feminina com hormônios sexuais sintéticos.....	15
1.1.3 Efeitos dos hormônios masculinos sobre o sistema cardiovascular feminino	21
1.1.4 Segurança endometrial, hepática e genética com o uso de hormônios masculinos	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 ENCARTE DE PUBLICAÇÃO	28
4 CONCLUSÃO	53
5 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A transição da menacme para a menopausa é definida como o período de transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva da mulher. Com a progressão de tal transição, ocorre o esgotamento ovariano (SANTORO et al., 1996). Estabelecida a menopausa, há uma cessação permanente de síntese de estrogênio por atrofia dos ovários (BASARIA; DOBS, 2006) e redução de secreção de andrógenos: 50% de diminuição em comparação com faixas etárias mais jovens (SOULES et al., 2001).

Tais alterações hormonais causam diversas repercussões negativas à maioria destas mulheres, que vão desde aumento de predisposição a doenças orgânicas até sinais e sintomas tais como: Fogachos, secura nos olhos e vulvo vaginal, aumento do risco de doença cardíaca coronariana e de acidente vascular cerebral (JENSEN et al., 2010), perda de massa óssea, perda de massa magra, e aumento da gordura abdominal e do tecido adiposo visceral (DOBS et al., 2002), alterações lipídicas pró-aterogênicas, aumento da resistência à insulina, diabetes (POLOTSKY; POLOTSKY, 2010), insônia, ansiedade, esquecimento, depressão (JENSEN et al., 2010), distúrbios do sono, alterações de humor, prejuízo do trofismo vaginal, com queixas relacionados com a micção (CHUN et al., 2011), diminuição da receptividade sexual, da libido e do prazer, diminuição de bem-estar; humor disfórico e / ou motivação embotados e persistente fadiga, além de alterações da cognição e da memória (YASUI et al., 2012).

O interesse da medicina pela reposição de hormônios para estas mulheres iniciou-se na década de 60 do século passado. Conforme Herrington (2003), o médico Robert Wilson revolucionou ao lançar nos Estados Unidos da América um best-seller intitulado “Feminine Forever”, no qual reforçava as vantagens de reposição de estrógenos na menopausa. Tal entusiasmo foi reforçado com a crença de que tal reposição reduzia os riscos de doença cardiovascular. A partir de 1998, com o lançamento de “Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)”, não só tal crença começou a ruir como até mesmo uma sugestão de que a terapia de reposição hormonal (TRH) pudesse até aumentar o risco de doenças cardiovasculares, além da confirmação do aumento de incidência de câncer de mama relacionado a tal terapia.

Muitos estudos vêm sendo realizados com o propósito de estabelecer a relação risco-benefício da reposição de estrógenos. A Sociedade Norte Americana de Menopausa (2008) publicou sua posição sobre a reposição hormonal feminina nos anos de 2002, 2003, 2004 e 2007 e, diante da evolução de dados que afeta a relação risco-benefício da TRH feminina, o Conselho de Curadores da Sociedade achou necessário atualizar sua posição e convocou um painel consultivo (2007-2008) para esta nova avaliação. Concluiu que tal reposição é o tratamento mais eficaz para reduzir os sintomas vasomotores, como sudorese e ondas de calor, e para sanar sintomas moderados e graves da atrofia vulvovaginal, tais como secura vaginal, dispareunia e vaginite atrófica. Foram comprovados os benefícios para a prevenção da osteoporose e redução do risco de fratura óssea e para a prevenção de infecção urinária de repetição nessa fase da vida.

A reposição de andrógenos para mulheres é mais recente, mas a preocupação relativa a risco-benefício também se faz presente. A Sociedade Norte Americana de Menopausa (2005) publicou que há recomendação do uso de testosterona para mulheres na pós-menopausa com sintomas de diminuição do desejo sexual que angustie a paciente e quando não há outra causa identificável para sua disfunção sexual. Além disso, a terapia de testosterona deve ser associada a estrógeno, já que não há dados sobre a segurança do uso isolado da testosterona. Apenas o uso oral e intramuscular são aprovados e não existem dados de segurança suficientes para indicar o seu uso por tempo superior a seis meses.

Em revisão sistemática *Cochrane* foi observado que o uso de testosterona em doses farmacológicas pode melhorar a função sexual de mulheres que estão disfuncionais devido à idade, e este efeito foi usado para defender a reposição deste hormônio em mulheres com redução de libido. Além disso, também foi observado que o acréscimo de testosterona (sob suas variadas formas de apresentação) à TRH tem efeitos benéficos significativos na função sexual, quais sejam: aumento do número de eventos sexuais satisfatórios e prazerosos, da intensidade de orgasmos, do grau de libido ou desejo, da excitação sexual e melhoria da autoimagem sexual (SOMBOONPORN et al., 2005).

Alguns efeitos colaterais do uso de testosterona em mulheres têm sido descritos como sinais de virilização: aparecimento de pelos, engrossamento da voz, acne, alopecia e hipertrofia de clitóris; retenção hídrica; possibilidade de aumento dos níveis de colesterol (CRAIG; STITZEL, 2008). Em sua revisão sistemática, Somboonporn et al. (2005) ressaltam que ainda estão obscuros os efeitos adversos sobre o engrossamento da voz, o perfil de coagulação e sobre o hematócrito. Complicações em longo prazo como o câncer de mama, derrame e doenças coronárias também ainda não foram suficientemente pesquisados. Não foram analisados nesta revisão, os efeitos da TRH mais testosterona sobre a função hepática, a histologia endometrial e sobre os perfis hormonais.

A reposição de testosterona pode ser realizada sob a forma de medicação injetável, seja com base oleosa (liberação lenta) ou à base de éster (liberação rápida na circulação), oral, adesivo transdérmico e, ainda, sob a forma de gel (GEBARA et al., 2002). O uso oral, então, é uma das formas preconizadas para tal reposição, sob a dose de 1,25 (LOBO et al., 2003) a 2,50 (DOBS et al., 2002) mg/dia. Tal forma de reposição tem mostrado excelentes efeitos sobre a resposta sexual, sem a produção de uma virilização tão significativa quanto à reposição de androgênios injetáveis. Somam-se, no entanto, pesquisas no intuito de averiguar seu grau de confiança e seus efeitos negativos.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a investigação dos efeitos da administração da metiltestosterona em ratas controle e ovariectomizadas, sobre o sistema cardiovascular, órgãos vitais importantes: fígado, rins e coração, o endométrio; além de avaliar a segurança citotóxica e mutagênica desse tratamento.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Fisiologia da produção hormonal feminina

As mulheres durante a menacme (idade reprodutiva) contam com os ovários funcionantes como principal fonte de produção de hormônios femininos e também de hormônios masculinos. Os ovários são órgãos endócrinos extremamente complexos, são estimulados pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que são hormônios gonadotróficos produzidos pela hipófise e que, além de amadurecerem óvulos para a fecundação, sintetizam o estradiol nas células da granulosa e os andrógenos na teca e células hílares. O FHS estimula a enzima aromatase nas células da granulosa promovendo a aromatização dos andrógenos que são, assim, transformados em estrógenos, enquanto o LH estimula as células da teca a produzirem andrógenos: testosterona e androstenediona (BASARIA; DOBS, 2006).

Durante a menacme, o principal estrógeno produzido pela mulher é o 17-beta estradiol que é, então, secretado de forma cíclica e influencia profundamente a fisiologia e o comportamento das mulheres (JENSEN et al., 2010).

As glândulas supra-renais também têm um importante papel na produção de andrógenos, visto que produzem a deidroepiandrosterona (DHEA) e seus ésteres sulfurados (DHEAS). Embora a DHEA seja um andrógeno de fraca ação, ela é convertida em testosterona (e dehidrotestosterona) e em estradiol no sangue periférico (BASARIA; DOBS, 2006).

Os principais andrógenos produzidos pelas mulheres incluem a testosterona (T), a androstenediona (D₄A), a deidroepiandrosterona (DHEA), o sulfato de deidroepiandrosterona (S-DHEA) e a deidrotestosterona (DHT). A testosterona tem sido referida habitualmente como a principal representante da androgenicidade plasmática em mulheres. Circula no sangue, em grande parte ligada a proteínas carreadoras, principalmente às GLHS (globulinas de ligação aos hormônios sexuais). A fração não ligada às proteínas transportadoras representa a denominada

fração livre da testosterona, que se constitui na sua porção biologicamente ativa (FERNANDES et al., 2006).

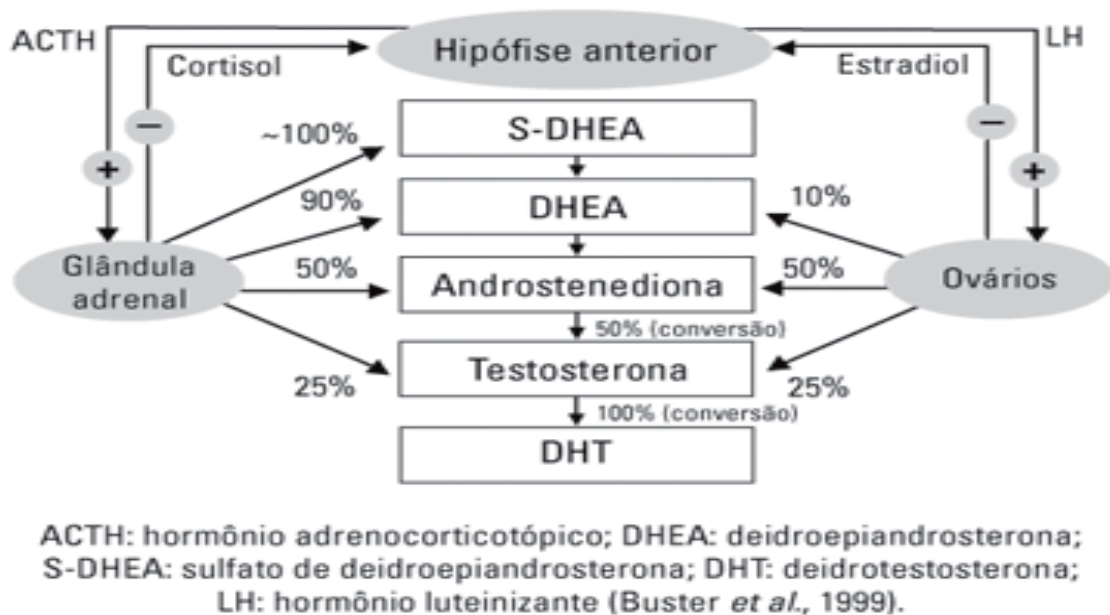


Figura 1: Produção de androgênios pela glândula da adrenal, pelos ovários e os percentuais de conversão periférica dos hormônios em mulheres durante os anos reprodutivos (FERNANDES et al., 2006).

A transição da menacme para a menopausa é definida como o período de transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva da mulher. Com a progressão de tal transição, ocorre o esgotamento folicular ovariano e o ovário torna-se menos sensível ao estímulo das gonadotrofinas, instalando-se um hipoestrogenismo relativo. Os ciclos ovulatórios ficam menos frequentes e ocorre irregularidade menstrual (SANTORO et al., 1996).

Denomina-se climatério a fase de transição que se inicia no final da menacme e se estende até a senilidade. Pode ser definido como o intervalo de tempo que compreende a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo, sendo considerada fase de crises pelas inúmeras transformações que nela ocorrem. A menopausa representa a última menstruação sendo, portanto, evento que ocorre no climatério. É o último fluxo menstrual, considerado após 12 meses de amenorréia (LIMA; BACARAT, 1995).

O declínio de estrogênios circulantes na perimenopausa induz assiduamente a sintomatologia de difícil tolerabilidade, que afeta o bem-estar da mulher (ALMEIDA et al., 2011). A mulher na pós-menopausa, com o declínio de hormônios ovarianos esteróides, frequentemente apresenta sintomas como ondas de calor com fogachos, secura dos olhos e de mucosa vulvovaginal, distúrbios do sono com insônia, alterações de humor com sintomas de ansiedade e depressão, sintomas relacionados com a micção devido a alteração do trofismo urogenital, alterações na resposta sexual, aumento do risco de doença coronariana e de acidente vascular cerebral (CHUN et al., 2011; JENSEN et al., 2010), além de perda de massa óssea, perda de massa magra, e aumento da gordura abdominal e tecido adiposo visceral, devido ao envelhecimento e declínio da secreção dos hormônios ovarianos, sendo que essas mudanças na composição corporal podem aumentar o risco de problemas, especialmente a osteoporose e doenças cardiovasculares (DOBS et al., 2002).

Conforme Polotsky e Polotsky (2010) há possibilidade de que o desequilíbrio estrogênico seja a causa mais provável de síndromes metabólicas durante a perimenopausa, contribuindo para o aumento de peso e risco adicional de hipertensão, alterações lipídicas pró-aterogênicas, aumento da resistência à insulina, diabetes e doença cardiovascular.

O declínio de estrogênios circulantes na perimenopausa induz assiduamente a sintomatologia de difícil tolerabilidade, que afeta o bem-estar da mulher (ALMEIDA et al., 2011). A mulher na pós-menopausa, com o declínio de hormônios ovarianos esteróides, frequentemente apresenta sintomas como ondas de calor, distúrbios do sono, alterações de humor, sintomas relacionados com a micção e alterações na função sexual (CHUN et al., 2011).

Na medida em que há o envelhecimento da mulher há, também, redução dos níveis de outros hormônios incluindo os andrógenos (testosterona e androstenediona). O ápice deste declínio ocorre entre os 40 e 50 anos (BURGER et al., 1995).

O declínio de andrógenos na mulher começa a ocorrer antes mesmo de menopausa. Já se inicia por volta dos 30 anos de idade e isso pode causar a síndrome da

insuficiência androgênica feminina (LEÃO et al., 2006). O termo "insuficiência androgênica feminina" foi definido como sendo composto de um padrão de sinais e sintomas na presença de diminuição da testosterona biodisponível, mas com estrogênio em níveis normais (BACHMANN et al., 2003; FERNANDES et al., 2006).

Em consequência da redução dos níveis de andrógenos na época da menopausa, as mulheres nesta fase, frequentemente, apresentam prejuízo da resposta sexual com redução da libido, diminuição da receptividade sexual, diminuição de bem-estar; humor disfórico e/ou motivação embotados com depressão de humor, e persistente fadiga, enquanto os sinais clínicos incluem perda de massa óssea, diminuição da massa e força muscular e alterações da cognição e da memória (BACHMANN et al., 2003; FENANDES et al., 2006; LEÃO et al., 2006; YASUI et al., 2012).

1.1.2 Modulação hormonal feminina com hormônios sexuais sintéticos

A reposição de hormônios femininos na menopausa tem sido realizada há várias décadas, sendo que, ainda hoje, há controvérsias a respeito da relação de risco-benefício. Segundo Aldrigh (2003), foi realizada a segunda reunião de conselho europeu de menopausa na Grécia e, entre as conclusões, as indicações atuais da referida reposição se faz nos seguintes casos: sintomas menopausais como ondas de calor e secura vaginal, com uso da menor dose efetiva e prescrita durante a vigência dos sintomas; mulheres em risco para osteoporose, sendo que, caso de tratamento de longa duração, é necessária uma reavaliação a respeito de vantagens e desvantagens após cinco anos de uso. O consenso reafirmou que a terapia de reposição hormonal não deve ser prescrita visando prevenção de doença cardiovascular primária e secundária, nem a prevenção da perda de memória ou demência em mulher após a menopausa.

A Sociedade Norte Americana de Menopausa (2008) publicou sua posição sobre a reposição hormonal feminina nos anos de 2002, 2003, 2004 e 2007 e, diante da evolução de dados que afetam a relação risco-benefício da TRH feminina, o Conselho de Curadores da Sociedade achou necessário atualizar sua posição e convocou um painel consultivo (2007-2008) para esta nova avaliação. Concluíram

que a reposição de estrógenos é o tratamento mais eficaz para reduzir os sintomas vasomotores como sudorese e ondas de calor e para sanar sintomas moderados e graves da atrofia vulvovaginal, tais como secura vaginal, dispareunia e vaginite atrófica. Foram comprovados os benefícios para a prevenção da osteoporose e redução do risco de fratura óssea e para a prevenção de infecção urinária de repetição nessa fase da vida. Não houve alteração significativa no ganho de peso corporal ou no índice de massa corporal (IMC). A TRH não é indicada para proteção coronariana, porém, quando indicado para tratar outros sintomas, parece não aumentar o risco de eventos coronarianos. Ainda há controvérsias, também, quanto ao risco de acidente vascular cerebral. Meta-análise de dados sugere que a hormonioterapia melhora a resistência à insulina em mulheres pós-menopausadas, porém não há evidência científica que indique a TRH para prevenção ou controle do diabetes mellitus. Não há comprovação de efeito benéfico sobre a memória e cognição, assim como de efeito antidepressivo de terapia estrogênica e já foi observado que o uso de progestágenos pode produzir piora do humor. A TRH aumenta o risco de câncer de mama, quando usada por mais de cinco anos e aumenta o risco de câncer de endométrio, quando o estrógeno é usado sem a progesterona.

Conforme ressaltam Chun et al. (2011), mulheres de meia-idade e idosas vêm passando por mudanças de estilo de vida devido a longevidade. A qualidade de vida no período pós-menopausal tem sido muito valorizada, visto que as pessoas estão vivendo por maior número de anos, devido aos avanços da ciência, da medicina e melhoria do status econômico.

Villa et al. (2011) afirmam que é recomendável proceder a reposição de hormônios femininos com a menor dose eficaz e pelo menor tempo possível, de modo a obter melhoria dos sintomas sem efeitos adversos da terapia. Em seu trabalho, concluíram que houve melhoria do perfil lipídico e melhoria da reatividade vascular de mulheres menopausadas, com o uso de doses baixas de estradiol associada a drospirenona (progestágeno com efeitos anti-androgênicos). A suposição de que a reposição estrogênica possa preservar as funções cognitivas de mulheres climatéricas veio de experimentos com animais, que mostram haver efeito protetor do estrogênio sobre as estruturas cerebrais. Em relação à TRH em mulheres, no entanto, não há

evidência de que a reposição estrogênica, associada ou não a progestágenos, possa prevenir declínio cognitivo em mulheres pós-menopáusicas, quando administrada por curto ou por longo prazo (até cinco anos). Portanto, com base nas evidências disponíveis, ela não pode ser recomendada para a melhoria cognitiva geral ou manutenção da cognição em mulheres idosas pós-menopausadas (LETHABY et al., 2008).

A TRH na pós-menopausa foi frequentemente usada com a intenção de prevenir a doença coronária nas mulheres, com base na plausibilidade biológica e dados observacionais, conforme afirma Keating et al. (1999). Sanchez et al. (2005), avaliando os resultados dos efeitos da TRH sobre doenças cardiovasculares, tromboembolismo venoso e acidente vascular cerebral, concluíram que, atualmente não há recomendação para que a mesma seja usada objetivando a prevenção de eventos cardiovasculares em mulheres pós-menopausadas (com ou sem doença cardiovascular anterior), além de que as mulheres com outros fatores de risco para eventos tromboembólicos venosos devem, inclusive, ser desencorajados de fazerem tal uso.

Ainda de acordo com Sanchez et al. (2005), estudos foram realizados com 24.000 mulheres que haviam sido escolhidas aleatoriamente para tomar hormônios ou placebo todos os dias por cerca de cinco anos. Os autores não encontraram nenhuma evidência que a terapia hormonal ofereça benefícios cardiovasculares para mulheres na pós-menopausa com ou sem doença cardíaca. Em vez disso, mulheres que usaram hormônios apresentaram maior incidência de ataques cardíacos não-fatais, derrame e embolismo em membros inferiores e pulmões do que as mulheres que usaram placebo.

De acordo com Almeida et al. (2011), com base em seu estudo avaliando ganho ponderal em mulheres com uso de TRH (estrógeno e progestágeno) com 132 mulheres com dois anos de pós-menopausa constatou-se que não há diferença significativa entre o aumento ponderal médio do grupo controle e do grupo sob TRH. Concluíram, então que, apesar da crença comum do aumento do peso associado à TH, os resultados do estudo contrariaram esse aspecto, não havendo um ganho ponderal adicional ao normalmente associado a este período da vida da mulher.

Kongnyuy et al. (2000), em sua revisão sistemática (meta-análise) com avaliação de três grupos de mulheres - um deles com uso de estrógeno isolado, outro com estrógeno associado a progestágeno e o terceiro grupo sem TRH - não encontraram nenhuma evidência de que a TRH, tanto com o uso isolado de estrogênio quanto com uso de estrógeno associado a progesterona causasse diferença significativa no ganho de peso médio e no IMC entre as mulheres pertencentes a cada um dos três grupos. Além disso, a meta-análise não encontrou nenhuma evidência de que o uso da TRH impeça o ganho de peso normalmente experimentado na menopausa. Não há evidência suficiente disponível a partir de estudos randomizados capazes de verificar que o uso de TRH evite ou limite a redistribuição da gordura corporal típica da menopausa que passa o corpo feminino da forma andrógina (da forma de pêra para a forma de maçã).

O uso de reposição de andrógenos para mulheres menopausadas é mais recente que a reposição dos hormônios femininos, tendo efeito favorável para a função sexual e atividade sexual, na sensação de bem-estar, no aumento da densidade mineral óssea e na melhora da fadiga geral (YASUI et al., 2012).

A terapia androgênica pode ter um papel no tratamento da disfunção sexual em mulheres na menopausa, com baixos níveis de androgênios e sem outras causas identificáveis de problema sexual, apresentando melhora significativa do desejo, da excitação e das fantasias sexuais (BACHMANN et al., 2003; SHERWIN; GELFAND, 1985), além de aliviar sintomas e sinais da síndrome da insuficiência androgênica, sem aumento de fatores de risco cardiovascular em doses fisiológicas (LEÃO et al., 2006).

Ness et al. (2009) com base em pequenos ensaios clínicos observou que o efeito de estrogênio associado à testosterona foi superior ao do estrogênio isolado no aumento de massa magra, na redução de gordura corporal e no aumento da densidade óssea. Leão et al. (2006), no entanto, verificaram um aumento modesto no peso corporal com a reposição de metiltestosterona na dose de 1,25 mg/dia.

Somboonporn et al. (2005) fizeram um trabalho de revisão sistemática sobre efeitos positivos e efeitos colaterais do uso de testosterona. Basearam-se em trinta e cinco

estudos com um total de 4768 participantes em uso de testosterona por um tempo médio de seis meses (variação de 1,5 a 24 meses). A maioria dos ensaios era de qualidade adequada com relação à randomização e ocultamento da seqüência de alocação. Foram utilizados implantes de testosterona, metiltestosterona e adesivos de testosterona para tal reposição e o estudo foi realizado por dois revisores independentes. A constatação foi a de que o uso de testosterona em doses farmacológicas pode melhorar a função sexual de mulheres que estão disfuncionais devido à redução de testosterona. A revisão sistemática realizada por Somboonporn et al. (2005) observou que o acréscimo de testosterona (sob suas variadas formas de apresentação) à TRH tem efeitos benéficos significativos sobre a resposta de desejo sexual, excitação sexual e orgasmos.

Os sintomas e sinais da síndrome da insuficiência androgênica feminina podem ser aliviados com reposição de andrógenos, terapia que vem sendo amplamente aceita e, quando são usadas doses recomendadas (estradiol percutâneo na dose de 1mg/dia associado a metiltestosterona na dose de 1,25 mg/dia), os benefícios são alcançados sem aumento dos fatores de risco cardiovasculares (LEÃO et al., 2006).

Lobo et al. (2003) observaram que após o uso de estrógeno associado à metiltestosterona, houve aumento significativo de testosterona biodisponível, supressão da globulina de ligação aos hormônios sexuais (GLHS) e um aumento da intensidade e frequência de desejo sexual. Entretanto, não existem trabalhos avaliando o efeito do uso de metiltestosterona, associado ou não com estrógenos, sobre o controle reflexo da pressão arterial nessa situação.

De acordo com Fernandes et al. (2006), como regra geral, a terapia com andrógenos (TA) não é oferecida para mulheres na pós-menopausa sem o emprego concomitante da terapia estrogênica (TE), visto que esta última, isoladamente, pode propiciar uma série de benefícios, como o alívio dos sintomas menopáusicos, a melhora da secura vaginal e um realce da sexualidade feminina. Tais efeitos podem minimizar a necessidade do emprego da TA. Eles ressaltam que praticamente inexitem estudos no período da pós-menopausa com o emprego da TA isolada, como também não existem estudos bem controlados da TA nas mulheres durante a menacme.

Segundo Somboonporn et al. (2005) o uso de testosterona sozinha em mulheres na pós-menopausa não pode ser recomendada até que os dados adequados relativos a segurança estejam disponíveis. Mais estudos abordando o uso de testosterona associada apenas a estrogênio contra testosterona isolada em mulheres na pós-menopausa são obrigatórios. A maioria dos estudos em que a metiltestosterona foi administrada não inclui a co-administração de uma progestina. Por conseguinte, os efeitos da metiltestosterona associada a estrogênio e progestina em mulheres com menopausa natural requer estudo posterior.

A reposição de testosterona pode ser realizada sob a forma de medicação injetável, seja com base oleosa (liberação lenta) ou à base de éster (liberação rápida na circulação), oral, adesivo transdérmico e, ainda, sob a forma de gel (GEBARA et al., 2002).

Alguns efeitos colaterais do uso de testosterona em mulheres têm sido descritos como sinais de virilização: aparecimento de pelos, engrossamento da voz, acne, alopecia e hipertrofia de clitóris; retenção hídrica; possibilidade de aumento dos níveis de colesterol (CRAIG; STITZEL, 2008).

Em revisão sistemática *Cochrane* foi observada maior incidência de hirsutismo. O crescimento de pêlos faciais e aparecimento de acne foram aumentados claramente com a adição de testosterona à terapia hormonal. Além disso, com os dados da revisão, a terapia com testosterona deve ser limitada a utilização de curto prazo, já que estudos de longo prazo não estão disponíveis. Ainda estão obscuros os efeitos adversos sobre o engrossamento da voz, o perfil de coagulação e sobre o hematócrito. Complicações a longo prazo como o câncer de mama, derrame e doenças coronárias não foram suficientemente pesquisados. Não foram analisados na revisão, os efeitos da TRH mais testosterona sobre a função hepática, a histologia endometrial e sobre os perfis hormonais (SOMBOONPORN et al., 2005).

A metiltestosterona é um andrógeno sintético cientificamente denominado 17-hidroxy-17-methylandroster-4-en-3-one. É formada quando a molécula da testosterona é modificada por meio de 17-alfa-alkilação e um grupo metila (CH₃) é introduzido na posição C17, conforme demonstrado na figura 2. A metiltestosterona foi o

primeiro andrógeno 17-alfa-alkilado. Estes andrógenos retardam a inativação hepática da testosterona e, por isso, em geral, podem ser usados por via oral (SHAHIDI, 2001).

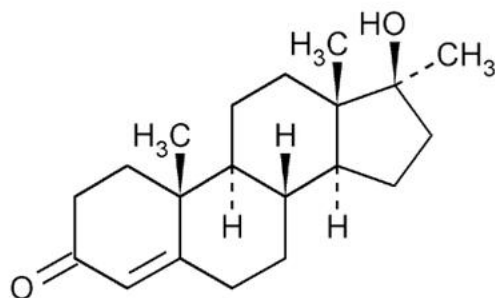


Figura 2: Molécula da metiltestosterona, onde se pode observar a metilação na posição C17 alfa (FARMACOPÉIA AMERICANA).

1.1.3 Efeitos dos hormônios masculinos sobre o sistema cardiovascular feminino

O efeito protetor dos hormônios sexuais femininos, em sua produção fisiológica, sobre o aparelho cardiovascular é bastante conhecido. Quando se compara a incidência de hipertensão arterial entre gêneros, observa-se que as mulheres, até a menopausa, apresentam menor prevalência de hipertensão arterial e doenças relacionadas em relação aos homens. No entanto, após a menopausa, as mulheres passam a apresentar prevalência de hipertensão arterial similar a dos homens. Acredita-se que a deficiência de estrógenos, alterações do perfil lipídico, ganho de peso e sedentarismo sejam os principais fatores associados à maior prevalência de hipertensão arterial em mulheres na menopausa quando comparadas àquelas na pré-menopausa (ZANESCO; ZAROS, 2009).

Entretanto, o uso de hormônios femininos na menopausa, sob a forma de reposição, de acordo com os estudos randomizados controlados publicados nos últimos anos, não se mostrou benéfico em mulheres com doença vascular estabelecida nem em mulheres saudáveis, sendo que no estado atual de conhecimento, não existem evidências que justifiquem o uso de TRH para prevenção primária ou secundária de doenças cardiovasculares (PARDINI, 2007). Conforme já comentado anteriormente,

a Sociedade Norte Americana de Menopausa (2008) não indica a TRH para proteção coronariana, porém, quando indicado para tratar outros sintomas, parece não aumentar o risco de eventos coronarianos.

Com relação à reposição de hormônios masculinos para mulheres, em doses terapêuticas, parece não haver um aumento do risco cardiovascular através de alterações na pressão arterial (BRAUNTEIN, 2007). Outros fatores de risco cardiovasculares como a reatividade vascular, a viscosidade do sangue, a concentração de hemoglobina, os fatores de coagulação, ou a sensibilidade à insulina também não são alterados com o uso de testosterona em doses terapêuticas. A exceção se deve a uma redução da fração lipoproteínica de alta densidade do colesterol (HDL) com o uso de testosterona por via oral (BRAUNTEIN, 2007). Somboonporn et al. (2005), em sua revisão, reafirma como evento adverso documentado em relação à adição de testosterona para terapia hormonal, uma diminuição significativa de níveis de HDL sérico.

Ainda sobre o perfil lipídico, Dobs et al. (2002) à partir de um estudo com uso de estrogênio isolado 1,25 mg versus estrogênio 1,25 mg associado a metiltestosterona 2,5 mg mostrou que após 16 semanas de tratamento houve diminuições significativas da colesterolemia total, HDL-colesterol e triglicérides no grupo estrogênio mais testosterona, com valores de fração lipoproteica de densidade baixa do colesterol (LDL) praticamente inalterada. O grupo que fez uso de estrógeno isolado demonstrou o efeito oposto sobre os lipídios com uma diminuição significativa nos níveis de colesterol LDL e nenhuma mudança significativa nos outros parâmetros lipídicos.

Em seu artigo, Leão et al. (2006) fizeram experimento com trinta e sete mulheres pós-menopáusicas com idade entre 42-62 anos, submetidas à histerectomia, seguindo um protocolo duplo-cego para receber, durante 12 meses, estradiol percutâneo na dose de 1 mg / dia, combinado a metiltestosterona na dose de 1,25 mg / dia ou combinado a placebo e observaram que não houve aumento expressivo dos fatores de riscos cardiovasculares. Entretanto, não foram encontrados estudos que tenham avaliado o efeito do tratamento com metiltestosterona sobre o controle reflexo da pressão arterial em ratas ovariectomizadas.

Dois dos principais mecanismos reflexos de controle do sistema cardiovascular são o barorreflexo e o reflexo cardiopulmonar. O primeiro possui como principal função a de proporcionar rápida e eficaz estabilização da pressão arterial (VASQUEZ et al., 1997). Os barorreceptores são pressoreceptores estimulados por ondas de pressão e reagem de modo intermitente e sincrônico de acordo com a pressão sistólica e com as variações de tensão vascular (IRIGOYEN et al., 2001).

Já os reflexos cardiopulmonares podem ser estimulados não apenas por mudanças na pressão nas câmaras cardíacas, mas também por agentes químicos (VASQUEZ et al., 1997). O reflexo de Bezold-Jarisch (RBJ) é ativado principalmente por receptores ventriculares, e mais comumente de ventrículo esquerdo, e várias substâncias são capazes de ativá-lo, tais como a prostaglandina, bradicinina, serotonina e fenilbiguanidina (FROZARD, 1982) e, quando ativados, promovem excitação de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos e inibição de tônus simpático (VASQUEZ, 1994).

Recentemente, alguns estudos têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar a sensibilidade dos reflexos cardiovasculares em animais sob influência de androgênios (EL MAS et al., 2002; BEUTEL et al., 2005; WARD; ABDEL-RAHMAN, 2005; WARD; ABDEL-RAHMAN, 2006; ANDRADE et al., 2008; BISSOLI et al., 2009). A maioria dos estudos tem explorado a influência do uso de esteróides anabolizantes (EL MAS et al., 2002; BEUTEL et al., 2005), ou reposição de testosterona em animais castrados (WARD; ABDEL-RAHMAN, 2005; WARD; ABDEL-RAHMAN, 2006) sobre a função barorreceptora, apontando para um efeito positivo sobre a resposta de bradicardia induzida pelo Barorreflexo quando esses hormônios são administrados em doses terapêuticas.

Estudo usando reposição de testosterona por uma semana demonstrou aumento da bradicardia mediada pelo barorreflexo em ratos castrados (WARD; ABDEL-RAHMAN, 2005). Adicionalmente, o tratamento com ciclosporina atenua a responsividade barorreflexa por meio, pelo menos em parte, da inibição da facilitação vagal induzida pela testosterona (EL MAS et al., 2002). Outro estudo avaliando o efeito da depleção de testosterona ou inibição do receptor de androgênio sobre a função barorreflexa, observou que a atenuação da bradicardia

mediada pelo barorreflexo pela castração ou bloqueio do receptor de androgênio envolve a interação entre androgênios e o receptor de androgênios (WARD; ABDEL-RAHMAN, 2006). Recentemente, Caminiti et al. (2009), investigaram o efeito da administração de testosterona por 12 semanas a pacientes idosos com insuficiência cardíaca crônica sobre a capacidade de exercício máxima, eficiência ventilatória, força muscular, resistência insulínica e a sensibilidade barorreflexa, sendo observado melhoria em todos os parâmetros, incluindo o barorreflexo. Portanto, a testosterona em nível fisiológico parece ter efeito positivo sobre a bradicardia mediada pelo barorreflexo.

Entretanto, Beutel et al. (2005) avaliaram o efeito do estanozolol, um esteróide anabólico androgênico, sobre o sistema cardiovascular, observando hipertensão, hipertrofia cardíaca e mudanças no barorreflexo. Assim, o benefício observado pela testosterona, em níveis fisiológicos, parece desaparecer quando se utiliza androgênios em altas doses.

Em relação aos reflexos cardiopulmonares só foram encontrados estudos que avaliaram o efeito de doses supra-fisiológicas (ANDRADE et al., 2008; BISSOLI et al., 2009; ANDRADE et al., 2011). Andrade et al. (2008) trataram ratos Wistar com doses elevadas de nandrolona por quatro semanas. Foi constatado que esse tratamento reduziu a frequência cardíaca basal, induziu hipertrofia cardíaca (com aumento de deposição de colágeno na matriz extracelular) e, todavia, não determinou alteração da sensibilidade do RBJ. Entretanto, tratamento por oito semanas, foi capaz de determinar redução do controle reflexo da pressão arterial e frequência cardíaca pelo RBJ, o que foi atribuído por maior nível de hipertrofia cardíaca e ausência de aumento de atividade vagal basal (BISSOLI et al., 2009). A co-administração de nandrolona com enalapril preveniu essas alterações (ANDRADE et al., 2011).

Todos os estudos acima foram realizados em ratos machos e, no caso do RBJ, apenas com doses de abuso de anabolizantes. Portanto, torna-se importante avaliar o efeito da metiltestosterona, usada isoladamente, em situações de deficiência estrogênica, como no caso de ratas ovariectomizadas.

1.1.4 Segurança endométrial, hepática e genética com o uso de hormônios masculinos

Segundo afirmaram Yasui et al. (2012) ainda não foi estabelecida a segurança da associação de androgênios à terapia hormonal no climatério em relação aos seus efeitos sobre mamas e endométrio. Complicações a longo prazo como o câncer de mama, derrame e doenças coronárias também ainda não foram suficientemente pesquisados. Não foram analisados em recente revisão sistemática, os efeitos da TRH mais testosterona sobre a função hepática, a histologia endometrial e sobre os perfis hormonais (SOMBOONPORN et al., 2005).

Especificamente em relação à metiltestosterona, Ness et al. (2009) afirmam que pouco se sabe a respeito dos efeitos adversos do uso prolongado de testosterona exógena. Comentam que há estudos que defendem a idéia de que níveis plasmáticos elevados de testosterona aumentam o risco de câncer de mama, embora não tenha havido significativa elevação no risco de câncer de mama relacionado ao uso de estrogênio associado a 1,25 mg de metiltestosterona por dia em seu experimento.

Wason et al. (2003) fizeram um experimento com uso de diversas doses de metiltestosterona em ratos wistar: veículo, 10, 100 e 600 mg/kg/dia e de ratas: veículo, 10, 40 e 200 mg/kg/dia por 28 dias para avaliação de seus efeitos endócrinos, entre outros. Fizeram análises laboratoriais, avaliação de peso e análises histopatológicas *post mortem*. Dentre as constatações mais relevantes, observaram aumento acentuado de peso das ratas que usaram a metiltestosterona, redução de colesterol total em todos os grupos de tratamento para ambos os sexos, aumento de triglicerídeos com o uso de dose alta e média de metiltestosterona em ambos os sexos e aumento da atividade de fosfatase alcalina em todos os três grupos de fêmeas tratadas. Em relação às análises histopatológicas, mostraram que houve alteração no útero das ratas submetidas a 100 e a 600 mg/kg/dia de metiltestosterona: hiperplasia e metaplasia epitelial e aumento do peso hepático no mesmo grupo.

A avaliação da toxicidade de um fármaco é muito importante para a avaliação do risco-benefício do mesmo. Esta avaliação por meio do teste de micronúcleos pode

observar a sua capacidade de produzir mutação genética por meio de mudança na cadeia de DNA (RIBEIRO et al., 2003).

Os agentes químicos que mudam a seqüência do DNA são chamados de genotóxicos, ou seja, são tóxicos para o gene. As mutações genéticas são muito associadas ao desenvolvimento de câncer. A genotoxicidade de uma substância é a capacidade de produzir mutação genética por meio de mudança na cadeia de DNA, principalmente a sua clastogenia (capacidade de produzir quebra de cromossomos). Portanto, conhecer a genotoxicidade de um agente químico é essencial para estabelecer o risco do mesmo para o homem (RIBEIRO et al., 2003).

Embora haja trabalhos avaliando a genotoxicidade da testosterona, eles sempre foram realizados com doses supra-fisiológicas de anabolizantes. Um deles é de Almeida et al. (2011) que pesquisaram estes efeitos do decanoato de nandrolona e mostraram sua genotoxicidade em células somáticas e germinais e efeitos clastrogênicos em células da medula óssea, este último observado por meio do teste do micronúcleo e outros dois são de Dorn et al. (2007) que avaliaram a citotoxicidade da tetrahydrogestrinona e trenbolona confirmando aumento significativo da taxa de micronúcleos e de Dorn et al. (2008) com o Madol 19-norandrostenediona, confirmando o aumento de micronúcleos e possível efeito citotóxico desses produtos. Tetrahydrogestrinona e trenbolona aumentaram a taxa de micronúcleos significativamente. Não foram encontrados trabalhos usando doses terapêuticas de metiltestosterona, o que torna necessária tal avaliação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento isolado com a metiltestosterona sobre o sistema cardiovascular, além do efeito geno e citotóxico, em ratas com ou sem ovariectomia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do tratamento isolado com metiltestosterona sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca basais de ratas com ou sem ovariectomia;

Avaliar o efeito do tratamento isolado com metiltestosterona sobre o controle reflexo da pressão arterial: baroreflexo e reflexo de Bezold-Jarisch, de ratas com ou sem ovariectomia;

Avaliar se o tratamento isolado com metiltestosterona determina hipertrofia cardíaca de ratas com ou sem ovariectomia;

Avaliar a presença de alterações ponderais e histopatológicas dos principais órgãos vitais: fígado, rins e coração, de ratas com ou sem ovariectomia;

Avaliar o efeito do tratamento com metiltestosterona sobre o útero (dados ponderais) de ratas com ou sem ovariectomia;

Avaliar se o tratamento isolado com metiltestosterona determina efeitos geno e citotóxicos por meio do teste do micronúcleo.

3 ENCARTE DE PUBLICAÇÃO

Efeito do uso isolado de metiltestosterona sobre os reflexos cardiovasculares e segurança genética e citotóxica em ratas ovariectomizadas

Denise Galvêas Terra, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES 29102-770 Brasil.

Iêda Carneiro Kalil, Msc, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES 29102-770 Brasil.

Andrews Marques do Nascimento, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES 29102-770 Brasil.

*Tadeu Uggere de Andrade, PhD, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES 29102-770 Brasil.

.

*Tadeu Uggere de Andrade, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista 29102-770 – Vila Velha – ES, Brazil. Número de Fax: 55-27-3421-2048; e-mail: tadeu.andrade@uvv.br.

Resumo

Objetivos: avaliar os efeitos cardiovasculares, hepáticos e renais, além da cito e genotóxicidade do uso isolado de metiltestosterona (MT) em ratas com ou sem ovariectomia.

Metodologia: os grupos sham veículo (SHAM), sham tratado com MT (SHAM+MT), ovariectomizado veículo (OVX) e ovariectomizado tratado com MT (OVX+MT), 21 dias após castração iniciaram o tratamento com MT na dose de 0,04 mg/kg/dia ou veículo por 28 dias. Ao final houve registro de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais e avaliação do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Em seguida, os animais foram eutanasiados e com retirada dos órgãos: coração, rins, fígado e útero para análise de peso e histológica. Realizou-se morfometria dos núcleos dos miócitos cardíacos. Os efeitos mutagênico e citotóxico foram avaliados a partir do teste de micronúcleo.

Resultados: A castração e/ou o uso da MT não promoveram alterações na PAM e FC, no RBJ, nem alterações no peso e histopatológicas no coração, fígado e rins. A MT preveniu o ganho de peso corporal determinado pela castração. As ratas OVX e OVX+MT apresentaram hipotrofia uterina em relação aos grupos SHAM. A castração diminuiu a função barorreflexa nos animais OVX, que foi prevenida pelo tratamento com MT, na dose e tempo de tratamento estabelecido. A MT não apresentou efeito genotóxico pelo ensaio do micronúcleo, na dose única de 0,04 mg/kg.

Conclusão: a metiltestosterona mostrou-se segura em relação ao sistema cardiovascular, fígado e rins e em relação a cito e genotoxicidade em células da medula óssea. Além disso, a MT não interferiu na hipotrofia uterina, nem no RBJ, porém, preveniu o ganho de peso e restaurou a sensibilidade do barorreflexo.

Palavras-chaves: Metiltestosterona - Barorreflexo - Reflexo Bezold-Jarisch - Hepatotoxicidade - Genotoxicidade.

Introdução

As alterações hormonais, com redução e/ou depleção de estrógenos e andrógenos, que ocorrem na menopausa causam inúmeras repercussões de ordem física e comportamental nas mulheres, dentre eles, fogachos, secura nos olhos e vulvo vaginal, aumento do risco de doença cardíaca coronariana e de acidente vascular cerebral¹, perda de massa óssea, perda de massa magra, aumento da gordura abdominal e de tecido adiposo visceral², diminuição da receptividade sexual, da libido e do prazer, diminuição de bem-estar, humor disfórico e / ou motivação embotados e persistente fadiga, além de alterações da cognição e da memória³.

Mulheres de meia-idade e idosas vêm passando por mudanças de estilo de vida devido à longevidade, havendo uma maior valorização da qualidade de vida no período pós-menopausal⁴. Essa busca tem sido feita, também, por meio da reposição hormonal nesta etapa da vida. Dentre os hormônios repostos, estão os estrógenos, os progestágenos (estes com finalidade de proteger o endométrio da ação isolada do estrógeno) e, mais recentemente, os andrógenos.

O uso oral de testosterona e derivados (metiltestosterona) é uma das formas preconizadas para a reposição androgênica, normalmente sob a dose de 1,25⁶ a 2,50² mg/dia e tem demonstrado efeitos positivos sobre a resposta sexual.

A revisão sistemática realizada pela *Cochrane* avaliou os riscos e os benefícios da utilização de testosterona em mulheres sob TRH. Foi observado que o uso de testosterona em doses terapêuticas pode melhorar a função sexual de mulheres que estão disfuncionais devido à idade, justificando a reposição deste hormônio em mulheres com redução de libido. O acréscimo de testosterona (sob suas variadas formas de apresentação) à TRH tem efeitos benéficos significativos na função sexual, quais sejam: aumento do número de eventos sexuais satisfatórios e prazerosos, aumento da intensidade de orgasmos, do grau de libido ou desejo e um aumento da excitação sexual e melhoria da autoimagem sexual.⁷ Em relação aos riscos a adição de terapia com testosterona foi associada com maior incidência de crescimento de pelos, de acne e redução no HDL colesterol. Ressalta-se, entretanto, que complicações em longo prazo, como o câncer de mama, derrame e doenças

coronárias, ainda não foram suficientemente pesquisados⁷. Também não foram analisados na revisão, os efeitos da TRH mais testosterona sobre a função hepática, a histologia endometrial e sobre os perfis hormonais.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a segurança da utilização isolada de metiltestosterona sobre o sistema cardiovascular, em especial sobre o controle reflexo da pressão arterial, sobre órgãos vitais (fígado, rins e coração) e o útero de ratas com ou sem ovariectomia. Além disso, também foi avaliada a presença de efeito genotóxico e citotóxico sobre a medula óssea por meio do teste do micronúcleo.

Métodos

Animais

Obtenção e Manutenção dos Animais Experimentais

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal da UVV (CEUA – UVV; protocolo nº 115/2010). Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 12 semanas de vida e peso corporal entre 190 a 250 g. As ratas eram mantidas no biotério da Universidade Vila Velha, com temperatura de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, em um ciclo 12 h claro/12 h escuro, e tiveram livre acesso à dieta padrão com pellet (ração Probiotério, Moinho Primor SA) e água.

Grupos Experimentais

Os animais foram separados em grupos experimentais, sendo:

- ✓ Grupo SHAM (n=6): ratas que sofreram cirurgia fictícia e que receberam apenas o veículo da metiltestosterona (metilcelulose);
- ✓ Grupo SHAM+MT (n=6): ratas que sofreram cirurgia fictícia e foram tratadas com metiltestosterona;
- ✓ Grupo OVX (n=6): ratas ovariectomizadas e que receberam apenas o veículo da metiltestosterona (metilcelulose);

- ✓ Grupo OVX+MT (n=6): ratas ovariectomizadas e que foram tratadas com metiltestosterona.

Ovariectomia das Ratas

A ovariectomia das ratas foi realizada sob anestesia: Hidroclorato de Cetamina (anestésico): 11,5 mg/100g peso intraperitoneal (i.p.) e Xilazina (relaxante muscular): 0,1 mg/100g peso i.p.^{8,9}, por meio de injeção intraperitoneal, no quadrante inferior esquerdo do abdomen.

A técnica utilizada consistiu em uma incisão de 1,0 a 1,5 cm entre a última costela e a coxa, a 1,0 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abertura da cavidade peritoneal para posterior ligadura das trompas uterinas e remoção dos ovários. O procedimento foi realizado bilateralmente. Após a retirada dos ovários foi realizada sutura da musculatura e da pele com fio de nylon 3,0 monofilamentado¹⁰. Ao final do procedimento foi administrado 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacin a 2,5% (Flotril®, Schering-Plough) via intramuscular.

As ratas SHAM foram obtidas por meio da realização de cirurgia fictícia, ou seja, foi realizada incisão em parede abdominal, sob o mesmo procedimento anestésico, mas não foram retirados os ovários.

Citologia Vaginal das Ratas

A coleta de secreção vaginal das ratas, para fim de citologia vaginal, foi realizada com uma pipeta de polietileno que continha uma gota (0,3 ml) de solução salina a 0,9%. A ponta da pipeta foi introduzida no orifício vaginal das ratas, tendo o soro sido ejetado e aspirado da cavidade vaginal¹¹. O conteúdo da pipeta foi então, pingado em lâmina histológica limpa e identificada, misturado a uma gota de lugol e coberto pela lamínula para observação ao microscópio.

Foi feita observação das células a fresco, sob o microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany), para identificação da fase do ciclo estral. Essa avaliação foi feita de acordo com as seguintes características¹²:

- ✓ Diestro I, também chamado de metaestro: quando se observa presença de células nucleadas, escamosas e leucócitos em igual quantidade;
- ✓ Diestro II: com presença de células nucleadas e leucócitos à observação microscópica;
- ✓ Proestro: auge da produção estrogênica, quando apenas células nucleadas são vistas na análise microscópica;
- ✓ Estro: queda da produção estrogênica e, na análise da citologia observa-se apenas células escamosas.

As ratas ovariectomizadas foram experimentadas apenas se confirmada a interrupção do ciclo e com características de citologia vaginal compatíveis com a fase Estro. Já as ratas SHAM foram experimentadas apenas se estivessem ciclando normalmente e à época do experimento deveriam estar na fase Proestro.

Protocolo de tratamento

Metade das ratas foi ovariectomizada e a outra metade foi submetida à cirurgia fictícia. No vigésimo primeiro dia após a cirurgia, elas foram pesadas, divididas aleatoriamente em dois grupos cada. Um dos grupos foi tratado por 28 dias com metiltestosterona e o outro apenas com o veículo, produzindo, assim os quatro grupos experimentais: SHAM (n=6); SHAM+MT (n=6); OVX (n=6) e OVX+MT (n=6).

A dose de metiltestosterona diária foi baseada na dose diária preconizada para mulheres (2,5 mg/dia)², considerando uma mulher de 70Kg. Portanto, usou-se a dose de 0,04 mg/kg e o peso das ratas foi reavaliado semanalmente para adequação da dose do fármaco.

A metiltestosterona foi solubilizada na concentração de 1,25 mg/mL de solução aquosa com metilcelulose (0,5%). O veículo foi composto apenas da solução de metilcelulose a 0,5%. Tanto a metiltestosterona quanto o veículo foram administrados via oral, por meio de gavagem. Os frascos foram mantidos em recipientes fechados e acondicionados em geladeira.

Avaliação da Hemodinâmica Cardiovascular

Foi aferida a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) das ratas quatro semanas após o uso de metiltestosterona (MT) ou do veículo.

Os registros de PAM e FC foram obtidos por meio de cateter implantado na artéria abdominal via artéria femoral esquerda. A veia femoral esquerda também foi cateterizada para possibilitar as administrações de drogas e infusão de salina durante as avaliações dos reflexos cardiovasculares. Os cateteres foram confeccionados utilizando-se um tubo de polietileno PE-50 (Clay Ams, Parsippany, EUA) de 15 cm de comprimento, unidos a um PE-10 de 5 cm por meio de aquecimento sob mandril.

As medidas hemodinâmicas foram realizadas com as ratas acordadas, pelo menos 12 h após o processo de cateterização, por meio da conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (Spectramed-Statham, P23XL, USA) acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (Biopac system, MP100, Santa Bárbara, CA, EUA).

Avaliação do Barorreflexo Arterial

Para avaliação do Barorreflexo foram utilizadas doses randomizadas de fenilefrina (0,5 – 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou nitroprussiato de sódio (1- 16 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) que induziram, respectivamente, aumentos e reduções na PAM e resposta reflexa de redução e aumento na FC. As doses foram injetadas em intervalos de 5 minutos, tempo suficiente para recuperação dos dados para valores basais. As drogas foram dissolvidas em salina (0,9%) e injetadas em volume constante de 0,05 mL / 100g de peso corporal, com um volume de administração de aproximadamente 0,1 mL de salina. Os valores de PAM e FC foram medidos antes e depois da administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio e os picos de mudanças nas duas variáveis foram usados na avaliação dos resultados. A relação entre as mudanças na PAM e respectivas alterações na FC foi avaliada por análise de regressão. O coeficiente de regressão (inclinação da curva) expresso como batimentos por minuto/mmHg foi utilizado como um índice da sensibilidade do Barorreflexo frente à fenilefrina (BRS_{PE}) e ao nitroprussiato (BRS_{NP})¹³.

Avaliação do Reflexo Bezold-Jarich

O reflexo de Bezold-Jarisch foi ativado quimicamente pela injeção intravenosa *in bolus* de doses randomizadas de fenilbiguanida (1,5- 24 mg kg⁻¹; Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, EUA). Para administração das doses de fenilbiguanida, o cateter venoso foi conectado a uma microseringa (Hamilton, EUA), através de um cateter de polietileno (PE 10), preenchido com salina. Entre cada dose foi dado um intervalo de 10 minutos para o retorno dos valores de pressão arterial diastólica (PAD) e FC para os níveis basais.

O reflexo foi identificado por reduções dose-dependentes na PAD e FC, simultaneamente, e avaliado através do valor relativo máximo de queda da FC e PAD após cada dose de fenilbiguanida¹⁴.

Análise Ponderal e Histopatológica de fígado, útero, rins e coração

Ganho de peso corporal

As ratas foram pesadas no dia da castração ou da cirurgia fictícia (peso inicial) e tiveram seus pesos reavaliados ao final do protocolo de tratamento (peso final), um dia antes da realização dos experimentos.

Análise ponderal das vísceras

Após a eutanásia por decaptação com auxílio de guilhotina, foi procedida a abertura da cavidade tóraco-abdominal das ratas para retirada dos órgãos (coração, fígado, rins e útero) que foram posteriormente analisados. Imediatamente após a sua retirada, os órgãos foram dissecados, retirando-se toda a gordura, mergulhados em salina, secos com papel e pesados (peso úmido). O peso dos órgãos foi utilizado para se obter a relação peso do órgão/peso corporal final (mg/g).

Análise Histopatológica das vísceras

O fígado, coração, rins das ratas foram acondicionados em frascos com formol a 10%, para fixação e encaminhados para análise histopatológica, que foi realizada por patologista cego para o estudo.

As amostras de tecido foram desidratadas e, em seguida, as peças foram impregnadas e incluídas em parafina para estudo histológico. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e destinados a observação em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany).

Por meio de análise qualitativa foram observadas as possíveis alterações macro e microscópicas do fígado, coração e rins.

Morfometria dos núcleos dos miócitos cardíacos

Após a avaliação histopatológica, foi realizada a captura de imagens, dez campos de cada lâmina, para análise morfométrica dos corações. Foram avaliados os seguintes parâmetros: medida da área dos núcleos dos miócitos e número de miócitos/campo em aumento de 400x. Para a captura e análise das imagens foi utilizado microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) acoplado ao sistema de aquisição e análise morfométrica (MOTICOM 2000; MOTIC INSTRUMENTS INC., Canadá).

Determinação do efeito geno e citotóxico da metiltestosterona por meio do teste do micronúcleo

Grupos experimentais

Para a realização do teste do micronúcleo, novos grupos experimentais foram utilizados apenas para esta finalidade. Os animais foram divididos da seguinte forma:

- ✓ Grupo CN, grupo controle negativo (n=5): recebeu somente o veículo;
- ✓ Grupo CP40, grupo controle positivo (n=5): recebeu uma administração de ciclofosfamida (40mg/kg de rata) 24h antes da eutanásia;
- ✓ Grupo MT, grupo tratado com metiltestosterona (n=5): recebeu a administração da droga (0,04 mg/kg de rata) 24 h antes da eutanásia.

Ensaio do micronúcleo

O ensaio foi conduzido conforme Schmid¹⁵ e Ribeiro et al.¹⁶ Os animais foram eutanasiados e a medula óssea contida nos dois fêmures de cada animal foi retirada com o auxílio de agulha e seringa previamente preenchida com 4mL de soro fetal

bovino. Essa suspensão foi agitada com o auxílio da pipeta de Pasteur e posteriormente centrifugada, por 10 minutos, a 1200 rpm. O sobrenadante foi parcialmente descartado, o restante foi ressuspensão para a confecção dos esfregaços.

Os esfregaços foram preparados pingando-se duas gotas da suspensão na extremidade fosca de uma lâmina e, com o auxílio de outra lâmina inclinada num ângulo de 45° e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com metanol e coradas com corante de Leishman. Foram preparadas três lâminas de cada animal, e estas foram lidas em microscópio, no aumento de 100x. Para cada lâmina foram contadas 1.000 células, sendo que nas primeiras 200 células contou-se tanto Eritrócitos normocromáticos (ENC) quanto eritrócitos policromáticos (EPC). Após atingir esse valor seguia-se a contagem de apenas EPC's até completar-se 1000. Pelo menos 2.000 EPCs foram contados e analisados por animal^{15,17}.

Os critérios para identificação do micronúcleo são seu tamanho, a sua forma e coloração. No tamanho, eles devem ter 1/10 a 1/20 do tamanho do EPC. O micronúcleo deve ser arredondado ou oval, com contorno liso e definido, e coloração azul escuro. O micronúcleo, geralmente, apresenta menor evidencia de estrutura interna que o núcleo das células nucleadas, mas são semelhantes, em aparência, a esses núcleos. A análise foi realizada por dois indivíduos cegos para o experimento para cada lâmina.

O resultado de genotoxicidade foi expresso pelo número de EPC contendo micronúcleos (EPCMN) e o resultado de citotoxicidade pela razão entre a quantidade ENC e EPC (ENC/EPC).

Análise estatística

Os valores foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e os do teste do micronúcleo com a média \pm desvio padrão (D.P.) Os dados de todos os testes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via. As modificações na PAD e FC induzidas pela fenilbiguanida no RBJ foram submetidas à ANOVA de duas vias. Em seguida utilizou-se o teste *post-hoc* de *Tukey* para

comparações múltiplas. Diferenças foram tomadas como significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Citologia Vaginal das Ratas

As ratas dos grupos OVX e OVX+MT apresentaram apenas células escamosas na análise dos esfregaços vaginais, compatível com a fase Estro. Já os esfregaços vaginais das ratas SHAM e SHAM+MT revelaram a presença de células nucleadas, compatível com a fase Proestro. Esses resultados referem-se à coleta de material feita na véspera do experimento.

Hemodinâmica Cardiovascular

Não houve diferença na PAM (SHAM: 106 ± 2 mmHg; SHAM+MT: 107 ± 3 mmHg; OVX: 106 ± 7 mmHg; OVX+MT: 107 ± 3 mmHg), nem na FC (SHAM: 339 ± 13 bpm; SHAM+MT: 318 ± 13 bpm; OVX: 340 ± 15 bpm; OVX+MT: 337 ± 9 bpm) basais entre os diferentes grupos experimentais.

Barorreflexo Arterial

As tabelas 1 e 2 apresentam o resultado da variação da FC frente aumentos ou reduções da PAM induzidos pela fenilefrina e nitroprussiato, respectivamente. A castração das ratas determinou redução das respostas taqui e bradicárdicas do barorreflexo ($p < 0,01$ em relação aos grupos SHAM e SHAM+MT) e o tratamento com metiltestosterona foi capaz de reverter essa alteração nas ratas do grupo OVX+MT ($p < 0,01$ em relação ao grupo OVX, nas três últimas doses de fenilefrina e em todas as doses de nitroprussiato). Adicionalmente, as ratas castradas apresentaram redução da sensibilidade do barorreflexo, tanto em relação à ativação pela fenilefrina ($BRS_{PE} = -1,611 \pm 0,110 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) quanto pelo nitroprussiato ($BRS_{NP} = -2,727 \pm 0,232 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$), em comparação com as ratas SHAM com ($BRS_{PE} = -2,075 \pm 0,112 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $BRS_{NP} = -3,774 \pm 0,255 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) ou sem ($BRS_{PE} = -2,352 \pm 0,207 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $BRS_{NP} = -3,540 \pm 0,137 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) o uso de MT. O tratamento com MT também foi capaz de recuperar a sensibilidade do

barorreflexo nas ratas do grupo OVX+MT ($BRS_{PE} = -2,356 \pm 0,199 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $BRS_{NP} = -3,824 \pm 0,255 \text{ bpm}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$), conforme representado na Figura 1.

Tabela 1: Aumento da PAM (mm Hg) evocados por fenilefrina e redução reflexa da FC (batimentos por minuto) em ratas SHAM e OVX após tratamento com MT.

Groups	Felilefrina ($\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$; i.v.)				
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
SHAM					
ΔPAM	23,3 \pm 5	28,8 \pm 5	35,2 \pm 4	51,3 \pm 5	70,1 \pm 5
ΔFC	-56,2 \pm 6	-64,7 \pm 4	-80,3 \pm 5	-121,8 \pm 7	-185,5 \pm 6
SHAM+MT					
ΔPAM	26,5 \pm 4	30,8 \pm 3	40,3 \pm 4	-59,5 \pm 6	67 \pm 5
ΔFC	-54,7 \pm 5	-61,2 \pm 6	-83,7 \pm 5	-123,6 \pm 8	-180 \pm 7
OVX					
ΔPAM	19,8 \pm 5	25,4 \pm 4	34,8 \pm 5	48,3 \pm 5	60,4 \pm 5
ΔFC	-34,8 \pm 3**	-43,1 \pm 5**	-57,6 \pm 3**	-86,4 \pm 5**	-115,4 \pm 6**
OVX+MT					
ΔPAM	18,8 \pm 4	26,8 \pm 5	39,4 \pm 3	49,8 \pm 4	65,4 \pm 6
ΔFC	-42,8 \pm 5**	-42,8 \pm 4**	-78,4 \pm 3 ^{§§}	-108,8 \pm 6 ^{§§}	-182,6 \pm 7 ^{§§}

Valores estão expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0.01$ comparado com os grupos SHAM e SHAM+MT. ^{§§} $p < 0.01$ comparado com grupo OVX.

Tabela 2: Decréscimo na PAM (mm Hg) evocado por nitroprussiato e aumento reflexo da FC (batimentos por minuto) nas ratas SHAM e OVX após tratamento com MT.

Groups	Nitroprussiato ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$; i.v.)				
	1.0	2.0	4.0	8.0	12.0
SHAM					
ΔPAM	-17,3 \pm 3	-22,8 \pm 5	-28,3.2 \pm 4	-33,2 \pm 5	-40,5 \pm 5
ΔFC	61,3 \pm 2	83,7 \pm 4	-101,2 \pm 5	-117,8 \pm 7	-156,5 \pm 6
SHAM+MT					
ΔPAM	-15,4 \pm 4	-23,4 \pm 3	-30,2 \pm 4	-35,2 \pm 6	-39,4 \pm 5
ΔFC	57,7 \pm 5	-89,5 \pm 6	116,2 \pm 5	129,6 \pm 8	147,6 \pm 7
OVX					
ΔPAM	-12,4 \pm 5	-20,3 \pm 4	-26,7 \pm 5	-31,5 \pm 5	-41,2 \pm 5
ΔFC	42,4 \pm 3 ^{**}	56,4 \pm 5 ^{**}	74,1 \pm 3 ^{**}	81,8 \pm 5 ^{**}	99,8 \pm 6 ^{**}
OVX+MT					
ΔPAM	-16,8 \pm 4	-22,3 \pm 5	-28,9 \pm 3	-34,8 \pm 4	-39,8 \pm 6
ΔFC	69,8 \pm 5 ^{§§}	85,6 \pm 4 ^{§§}	108 \pm 7 ^{§§}	129,8 \pm 6 ^{§§}	153,4 \pm 7 ^{§§}

Valores estão expressos como média \pm E.P.M. ^{**}p<0.01 comparados com os grupos SHAM e SHAM+MT. ^{§§}p<0.01 comparado com grupo OVX.

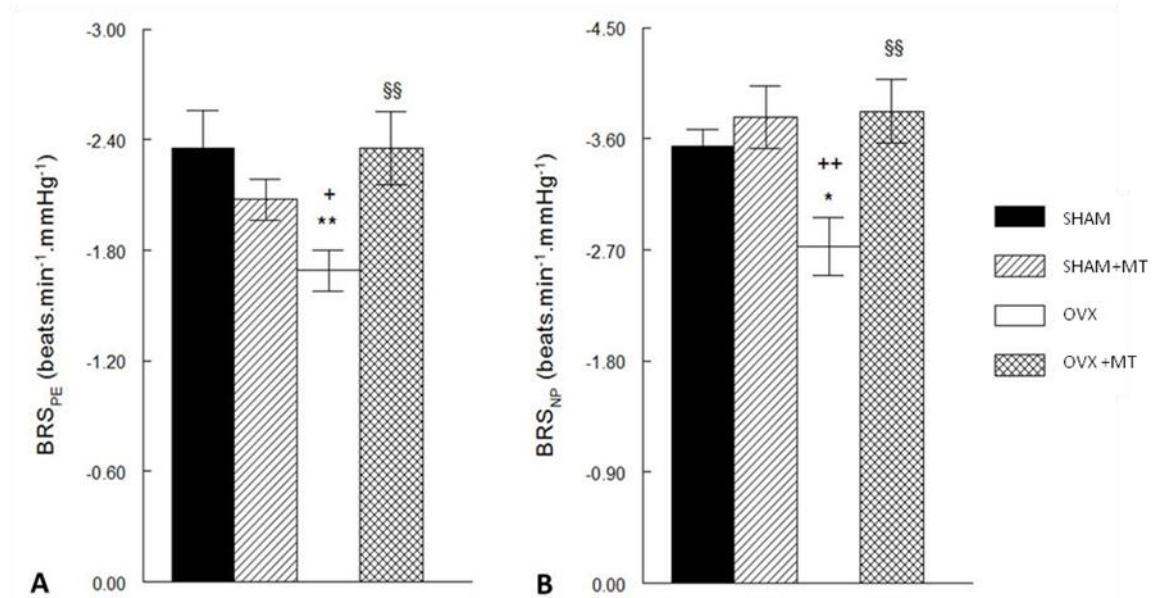


Figura 1: Sensibilidade do barorreflexo (BRS) em relação à fenilefrina (Painel A; BRS_{PE}) ou ao nitroprussiato (Painel B; BRS_{NP}) em ratas SHAM e OVX. S: animais sham operados; S+MT: ratas sham operadas com tratamento de metiltestosterona; C: animais castrados; C+MT: animais castrados com tratamento de metiltestosterona. Valores estão expressos como média ± E.P.M. **p<0.01 and *p<0.05 comparado com grupo SHAM. ++p<0.01 e +p<0.05 comparado com grupo SHAM+MT. §§p<0.01 comparado com grupo OVX.

Reflexo Bezold-Jarisch

Como pode ser observado na Tabela 3, a fenilbiguanida determinou reduções dose-dependentes na PAD e FC. Nem a castração nem o tratamento com a metiltestosterona alteraram a resposta hipotensora e bradicárdica induzidas pela fenilbiguanida e, portanto, não houve alteração do reflexo Bezold-Jarisch.

Tabela 3: Decréscimo (percentagem; %) na pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) provocado por injeção de fenilbiguanida em ratas SHAM e OVX tratadas com MT

Groups	Fenilbiguanida ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$; i.v.)				
	1.5	3.0	6.0	12.0	24.0
SHAM					
PAD	27,9 \pm 3	41,7 \pm 5	68,4 \pm 4	77,8 \pm 5	89,1 \pm 5
FC	33,8 \pm 6	47,3 \pm 4	59,0 \pm 5	72,5 \pm 7	80,3 \pm 6
SHAM+MT					
PAD	24,8 \pm 4	47,4 \pm 3	63,1 \pm 4	72,4 \pm 6	86,2 \pm 5
FC	24,6 \pm 5	50,5 \pm 6	64,5 \pm 5	78,1 \pm 8	81,8 \pm 7
OVX					
PAD	18,8 \pm 5	37,1 \pm 6	60,9 \pm 5	74,5 \pm 5	83,7 \pm 5
FC	23,8 \pm 3	52,6 \pm 5	65,1 \pm 3	74,3 \pm 5	84,9 \pm 6
OVX+MT					
PAD	19,6 \pm 6	36,3 \pm 7	65,8 \pm 3	81,8 \pm 4	90,3 \pm 6
FC	33,1 \pm 5	44,5 \pm 4	58,6 \pm 7	71,1 \pm 6	81,9 \pm 7

Valores são expressos como média \pm S.E.M.

Ganho de peso corporal

Não houve diferença significativa no peso corporal inicial das ratas dos diversos grupos experimentais (SHAM=160,7 \pm 3,2g; SHAM+MT=154,8 \pm 5,1g; OVX=157,1 \pm 4,3g; OVX+MT=164,3 \pm 5,4). Entretanto, ao final do período de tratamento as ratas do grupo OVX apresentaram peso corporal (265 \pm 12g; $p < 0,01$) e ganho de peso ($\Delta P = 81,3 \pm 9$ g; $p < 0,01$) superiores aos grupos SHAM (214 \pm 7g; $\Delta P = 41,0 \pm 8,1$ g) e SHAM+MT (219 \pm 7g; $\Delta P = 54,5 \pm 6,2$ g). O tratamento com MT preveniu esse aumento e ganho de peso nas ratas OVX+MT (219 \pm 10g; $\Delta P = 47,6 \pm 4,7$ g; $p < 0,01$ em relação ao grupo OVX).

Relação peso das vísceras/peso corporal e histopatologia das vísceras

Conforme pode ser observado na Tabela 4, não houve diferença na relação peso das vísceras/peso corporal entre os diferentes grupos experimentais. Com relação ao útero, as ratas OVX apresentaram redução da relação peso do útero/peso

corporal em relação aos grupos SHAM ($p < 0,01$). O tratamento com MT não foi capaz de alterar essa redução no grupo OVX+MT.

Tabela 4: Efeito da castração e do tratamento com metiltestosterona na relação do peso do coração, rim direito e esquerdo, fígado e útero (COR/PC, RD/PC, RE/PC, FIG/PC, U/PC) pelo peso corporal das ratas dos grupos.

Grupos	COR/PC	RD/PC	RE/PC	FIG/PC	U/PC
SHAM	3,437±0.162	3,591±0.236	3,805±0.208	31,554±2.892	2,264±0.256
SHAM+MT	3,417±0.164	4,040±0.325	3,815±0.193	33,683±1.274	1,987±0.321
OVX	3,144±0.191	3,406±0.228	3,461±0.181	31,054±3.091	0,931±0.135**
OVX+MT	3,532±0.173	3,949±0.172	3,822±0.238	32,476±1.339	0,897±0.213**

Valores estão expressos como média ± E.P.M. ** $p < 0,01$ comparados com grupo SHAM e SHAM+MT.

A análise histopatológica revelou que não houve diferença microscópica no parênquima hepático, renal e no músculo cardíaco entre as ratas dos grupos experimentais.

Morfometria dos miócitos cardíacos

Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos experimentais nos dados morfológicos analisados: número de núcleos de miócitos por campo de alta resolução (SHAM: 5,7±0,2; SHAM+MT: 4,9±0,4; OVX: 5,6±0,5; OVX+MT: 5,1±0,6) e área dos núcleos dos miócitos cardíacos (SHAM: 951±15 μm^2 ; SHAM+MT: 983±19 μm^2 ; OVX: 944±23 μm^2 ; OVX+MT: 979±17 μm^2).

Ensaio do micronúcleo

Conforme pode ser observado na Tabela 5, os animais do grupo controle positivo apresentaram maior número de EPCMN e menor relação ENC/EPC comparado ao grupo CN ($p < 0,01$). Os animais que receberam MT não apresentaram valores de EPCMN e ENP/EPC diferentes do controle negativo, mas foram significativamente menores e maiores, respectivamente, que os valores do grupo CP40 ($p < 0,01$).

Tabela 5: Número de erotrocitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) em 200 células e eritrocito policromático micronucleados (EPCMN) em 2000 EPCs, e a relação de EPC/ENC, na medulla óssea das ratas.

Grupos	EPC	ENC	EPCMN	EPC/ENC
CN	112±13	95±11	2.4±1.1	1.17±0.31
CP40	56±5 ^{**}	146±5 ^{**}	54.6±4.7 ^{**}	0.38±0.04 ^{**}
MT	106±7 ^{§§}	105±3 ^{§§}	3.3±1.3 ^{§§}	1.01±0.09 ^{§§}

CN: Controle Negativo; CP40: Controle positivo (Ciclofosfamida 40mg/kg); MT: Grupo tratado com metiltestosterona (0,04 mg/Kg). Valores estão expressos como média ± E.P.M. ^{**} p<0.01 comparado com grupo CN. ^{§§} p<0.01 comparado com grupo CP40.

Discussão

O presente trabalho demonstra evidências de que o tratamento com MT na dose de 0,04 mg/kg em ratas apresenta segurança para os principais órgãos vitais sem efeito cito e genotóxico. Além disso, a MT não só mostrou-se segura para o sistema cardiovascular como também reverteu o prejuízo do barorreflexo nas ratas ovariectomizadas. O tratamento com MT também preveniu o ganho de peso corporal que ocorre com a castração.

Efeito positivo da testosterona sobre o barorreflexo foi observado em ratos machos¹³, porém, o efeito de androgênios sobre esse reflexo em fêmeas não foi avaliado. El-Mas et al.¹³ observou que a castração de ratos machos atenuou significativamente o controle da bradicardia reflexa pelos barorreceptores e que houve restauração do mesmo em ratos submetidos à reposição de testosterona.

El Mas et al.¹⁸ demonstrou que o comprometimento da função barorreflexa induzido pela ciclosporina ocorreu através de redução dos níveis plasmáticos de testosterona e, conseqüente inibição de efeito facilitador desse hormônio sobre o controle cardíaco vagal. Ward e Abdl-Rahman¹⁹, demonstraram que a melhoria do barorreflexo pela testosterona não foi correlacionada à sua aromatização, visto que não foi observado aumento do nível de 17β-estradiol no soro dos ratos

orquiectomizados tratados com testosterona. Também foi demonstrado que o efeito da testosterona foi mediado por ação em receptores androgênicos, já que a flutamida foi capaz de determinar atenuação da bradicardia induzida pelo barorreflexo²⁰.

Apesar de os resultados da ação da testosterona sobre o barorreflexo em ratos machos apontarem para uma ação direta desse hormônio, sem a interferência de sua aromatização^{19,20}, não tem como ser excluída essa possibilidade no presente trabalho, já que os níveis plasmáticos desses hormônios não foram avaliados.

O 17 β -estradiol aumenta a bradicardia mediada pelo barorreflexo, fato comprovado pelos experimentos com o uso deste estrógeno em ratos machos²¹ e em ratas ovariectomizadas submetidas à reposição de estrógenos²². El-Mas e Abdel²³ também observaram que o tratamento de ratas ovariectomizadas com reposição de 17 beta-estradiol aumentou significativamente a sensibilidade do barorreflexo. Em mulheres, a sensibilidade barorreflexa (BRS) aumenta nas fases do ciclo menstrual nas quais os hormônios gonadais estão elevados, sendo que esta variação é abolida pela ovariectomia²⁴. Camundongos fêmeas castrados e com reposição de 17 β -estradiol tiveram melhoria do barorreflexo induzido pela fenilefrina²⁵.

Além de uma ação direta sobre receptores androgênicos e sua aromatização, outra possibilidade para explicar o efeito da MT sobre o barorreflexo seria a ação central da testosterona por pelo menos dois mecanismos centrais. O primeiro deles é a facilitação da neurotransmissão glutamatérgica que é fundamental para o processamento central das informações dos barorreceptores²⁶. O segundo mecanismo relaciona-se com o fato de a testosterona aumentar a expressão do mRNA central da vasopressina, que é conhecida por melhorar a função barorreflexa.²⁷ Adicionalmente, os receptores de androgênio têm sido caracterizadas em áreas do tronco cerebral que estão envolvidas na integração do barorreflexo^{27,28} e é possível, por conseguinte, que andrógenos possam atuar nestes centros vagais do tronco cerebral para modular a atividade cardiomotora²⁷.

Liu et al.²⁹ em seu trabalho, verificaram a ação isolada de testosterona e de estradiol e ação combinada de ambos em ratas ovariectomizadas submetidas à

isquemia e reperfusão, concluindo que nos três grupos houve redução da desidrogenase láctica e de apoptose de miócitos ventriculares. Portanto, a testosterona isolada também revelou aumento da cardioproteção.

Ao contrário do barorreflexo, o RBJ não sofreu alteração no grupo OVX e nem com reposição com MT. Isso indica que, provavelmente, o funcionamento deste reflexo não sofre grande influência dos níveis de estrogênio e que a MT não seria capaz de aumentar a sua sensibilidade para além de seu funcionamento normal. É sabido que a hipertrofia cardíaca influencia negativamente a função do RBJ^{18,19,20,22} e, de acordo com os resultados do presente trabalho, nem a castração, nem a reposição com MT foi capaz de determinar hipertrofia cardíaca, o que pode explicar a ausência de efeito sobre o RBJ. Não é do conhecimento dos autores a existência de dados da literatura sobre o efeito da castração tanto de machos quanto de fêmeas sobre o RBJ. Os únicos dados encontrados sobre a influência de androgênios sobre o RBJ são os estudos do nosso laboratório em que se observou prejuízo do funcionamento do RBJ sobre influência de doses supra-fisiológicas desses hormônios^{30,31,32}. No presente estudo, entretanto, as doses utilizadas foram baixas, o que pode ajudar a explicar a diferença dos resultados.

A castração e a reposição com MT não foram capazes de determinar alterações na PAM e FC basais. Isso poderia ser em decorrência do tempo de castração avaliado, porém, Tatchum-Talom et al.³³ comparou tais respostas entre ratas sham e ratas ovariectomizadas após sete meses de castração e também não encontrou diferenças. A presença de outros mecanismos compensatórios à ausência de estrogênio parece, então, ser uma explicação mais plausível.

A MT foi capaz de prevenir o aumento de ganho de peso nas ratas ovariectomizadas. Pantaleão et al.³⁴, observou menor ganho de peso em ratas tratadas com tibolona e, portanto, esse efeito da MT, pode ser resultado de sua aromatização e, conseqüente efeito estrogênico. A avaliação do ganho ponderal das ratas também é importante porque é significativamente relacionado ao aumento de riscos cardiovasculares³⁴. Portanto, a prevenção do aumento do peso corporal das ratas castradas e tratadas com MT, pode indicar, também, redução do risco cardiovascular.

A análise macro e microscópica do fígado, rins e coração, nos quatro grupos estudados, mostrou ausência de repercussões sobre tais órgãos, além de ausência de alteração ponderal destas vísceras no final do tratamento, o que indica que não houve efeito tóxico da MT sobre esses órgãos. Experimento anterior realizado por Wason et al.³⁵ revelou aumento de glicogênio intracelular e aumento de eosinófilos na zona centrolobular no fígado, além de dilatação corticotubular difusa dos rins das ratas, porém com doses muito mais altas (600 mg/kg) do que as usadas em nosso experimento.

A MT não foi capaz de reverter a hipotrofia uterina induzida pela castração, o que pode indicar ausência de aromatização ou formação de estrogênio em quantidade insuficiente para esse efeito, já que o estrogênio é conhecidamente trófico para o útero³⁵ e, ainda, podendo determinar metaplasia e hiperplasia que poderia cursar com desenvolvimento de câncer³⁴.

A avaliação do efeito mutagênico e citotóxico de metiltestosterona foi feita por meio do ensaio do micronúcleo *in vivo* em ratos. Observou-se que a dose de metiltestosterona utilizada não provocou aumento no número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em relação ao controle negativo, indicando que a metiltestosterona não apresenta ação mutagênica na dose utilizada, já que o resultado é considerado positivo para mutagenicidade apenas se o grupo teste apresentar um aumento estatisticamente significativo na frequência de EPCMN relacionado ao tratamento em qualquer tempo de amostragem¹⁶. Na avaliação da citotoxicidade da metiltestosterona utilizou-se a relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC). O grupo tratado com metiltestosterona apresentou diferença significativa da relação EPC/ENC comparado ao grupo CP40, não sendo diferente do resultado do grupo CN. Assim, este dado indicou que a metiltestosterona não apresenta atividade citotóxica³⁶. Almeida et al.³⁷ observaram que o decanoato de nandrolona apresentou genotoxicidade em células somáticas e germinais e efeitos clastrogênicos em células da medula óssea, porém em doses supra-fisiológicas. Outros androgênios foram capazes de determinar aumento de micronúcleos, como tetrahydrogestrinona e trenbolona³⁸, e Madol a 19-norandrostenediona³⁹.

Em síntese, ao analisar os resultados deste trabalho, pode-se concluir que a MT em dose terapêutica (0,04mg/kg) usada de modo isolado por 28 dias, sem associação com estrógenos, apresenta efeito benéfico sobre o barorreflexo e não evidenciou toxicidade relativa a fígado, rins e coração, nem efeitos deletérios sobre a PAM, FC e reflexo de Bezold-Jarisch. Mostrou-se, ainda, segura em relação à citotoxicidade e mutagenicidade em células de medula óssea. A ação do seu uso isolado, sem adição de estrógeno e progesterona, necessita de estudos mais detalhados, com o propósito de investigar as repercussões sobre mamas e endométrio uterino, com uso por tempo prolongado, já que análises morfométricas e histopatológicas do útero não foram realizadas no presente trabalho.

Perspectivas

Tem grande importância clínica a avaliação da segurança da metiltestosterona para sua prescrição a mulheres menopausadas com queixa de declínio de desejo sexual e dificuldade de orgasmo. Há, ainda, relevância na avaliação do seu uso isolado, sem adição de estrógenos e progestágenos, visto que há pacientes portadoras de contra-indicação para o uso de estrógenos e que deixam de ser beneficiadas no tratamento específico de disfunções sexuais por falta de experimentos avaliando as repercussões do uso isolado de andrógeno em doses terapêuticas em mulheres. Se os dados de segurança aqui obtidos forem confirmados clinicamente abre-se outra perspectiva para a melhoria da qualidade de vida da mulher pós-menopausada.

Referências

1. Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav* 2010;99:151-62.
2. Dobs AS, Nguyen T, Pace C, Roberts CP. Differential Effects of Oral Estrogen versus Oral Estrogen-Androgen Replacement Therapy on Body Composition in Postmenopausal Women. *J Clin Endocr Metab* 2002;87:1509–1516.

3. Yasui T, Matsui S, Tani A, Kunimi K, Yamamoto S, Irahara M. Androgen in postmenopausal women. *J Med Invest* 2012;59:12-27.
4. Chun JY, Min KS, Kang DIA. Study Assessing the Quality of Life Related to Voiding Symptoms and Sexual Functions in Menopausal Women. *Korean J Urol* 2011;52:858–864.
5. Burger HG, Dudley EC, Hopper JL et al. The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3537-4.
6. Lobo RA, Rosen RC, Yang HM, Block B, Van Der Hoop RG. Comparative effects of oral esterified estrogens with and without methyltestosterone on endocrine profiles and dimensions of sexual function in postmenopausal women with hypoactive sexual desire. *Fertil Steril* 2003;79:1341-52.
7. Somboonporn W, Davis S, Seif MW, Bell R. Testosterone for peri and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;4.
8. Zimmermann F, Weiss J, Reifenberg K. *Breeding and Assisted Reproduction Technics in the Laboratory Rats* (ed. Krink G.J). Academic Press London, 2000.
9. Shibutani M. *Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation in the Laboratory Rat* (ed. Krink G.J). Academic Press London, 2000.
10. Dantas AP, Scivoletto R, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium- derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999;34:914-919.
11. Vilela MG, Santos Júnior JL, Silva JGC. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina* 2007;35:667-670.
12. Nelson RJ. *An Introduction to Behavioral Endocrinology*, published by Sinauer Associates, Fourth Edition, 2011.

13. El-Mas MM, Afify EA, Mohy El-Din MM, Omar AG, Sharabi FM. Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. *J Cardiovasc Pharm* 2001;38:754-63.
14. Bissoli NS, Ciciline MA, Vasquez EC, Cabral AM. The diuretic chlortalidone normalizes baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes in DOCA-salt hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2000;41:483-491.
15. Schmid, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: W. Hollaender (ed.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, p.31-53. New York: Plenum Press, 1976.
16. Ribeiro L R, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.
17. Schimid, W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975;31:9-15.
18. El-Mas MM, Afify EA, Omar AG, Sharabi FM. Cyclosporine Adversely Affects Baroreflexes via Inhibition of Testosterone Modulation of Cardiac Vagal Control. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:346-354.
19. Ward GR, Abdel-Rahman AA. Effect of testosterone replacement or duration of castration on baroreflex bradycardia in conscious rats. *BMC Pharmacol* 2005;5:9.
20. Ward GR, Abdel-Rahman AA. Orchiectomy or androgen receptor blockade attenuates baroreflex-mediated bradycardia in conscious rats. *BMC Pharmacol* 2006;6:2.
21. Saleh TM, Connell BJ. Centrally mediated effect of 17 β -estradiol on parasympathetic tone in male rats. *Am J Physiol* 1999;276:R474-R 481.
22. Saleh MC, BJ Connell, Saleh TM. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Cérebro Res* 2000;879:105–114.

23. El M-Mas, M, Abdel-Rahman A. Estrogen enhances baroreflex control of heart rate in conscious ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharm* 1998;76:381-386.
24. Goldman GRK, Azar AS, Mulvaney JM, Hinojosa-Laborde C, Haywood JR, Brooks VL. Baroreflex sensitivity varies during the rat estrous cycle: role of gonadal steroids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R1419-26.
25. Pamidimukkala J, Taylor JA, Welshons WV, Lubahn DB, Hay M. Estrogen modulation of baroreflex function in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R983-9.
26. Van Giersbergen PLM, Palkovits M, Jong W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 1992;72:789–824.
27. Wang Z, De Vries GT. Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial amygdaloid nucleus in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 1995;7:827–831.
28. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1990, 294:76-95.
29. Liu A, Gao L, Kang S et al. Testosterone enhances estradiol's cardioprotection in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 2012;212:61-9.
30. Andrade TU, Santos MCS, Busato VCW et al. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarisch reflex control of bradycardia. *Arch Med Res* 2008;39:27-32.
31. Bissoli NS, Medeiros AR, Santos MC et al et al. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. *Pharmacol Res* 2009;59:379-384.

32. Andrade TU, Loiola LZ, Alcure SM et al. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone-decanoate-induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. *Can J Physiol Pharm* 2011;89:891-897.
33. Tatchum-Talom R, Eyster KM, Kost CK, Martin DS. Blood pressure and mesenteric vascular reactivity in SHR seven months after gonadectomy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;57:357–364.
34. Pantaleão JAS, Henriques HN, Carvalho ACB, Pollastril CE, Soares Filho PJ, Guzman-Silva MA. Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:124-30.
35. Wason S, Pohlmeyer-Esch G, Pallen C, Palazzi X, Espuña G, Bars R. 17 alfa-Methyltestosterone: 28-day oral toxicity study in the rat based on the “Enhanced OECD Test Guideline 407” to detect endocrine effects. *Toxicology* 2003;192:119–137.
36. Leite KR, Andrade LS, Sena JS, Vilar JB, Chen LC. Avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de Ginkgo biloba L. pelo teste do micrônúcleo em camundongos. *Rev Biol Neotropical* 2006;3:157-162.
37. Almeida JPM, Carnidei C, Branquinho M et al. Impact of hormone replacement therapy on body weight. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2011;33:310-314.
38. Dorn SB, Bolt HM, Thevis M, Diel P, Degen GH. Induction of micronuclei in V79 cells by the anabolic doping steroids tetrahydrogestrinone and trenbolone. *Arch Toxicol* 2007;82:257-63.
39. Dorn SB, Bolt HM, Thevis SM, Diel P, Degen GH. Micronucleus induction in V79 cells by the anabolic doping steroids desoxymethyltestosterone (madol) and 19-norandrostenedione. *Toxicol Lett* 2008;183:58-64.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho concluímos que a metiltestosterona em dose terapêutica e usada de modo isolado, sem associação com estrógenos ou progestágenos, apresenta: a) efeito benéfico sobre o barorreflexo; b) ausência de toxicidade sobre parênquima hepático; c) ausência de efeitos prejudiciais sobre parênquima renal; d) preservação de PAM, FC, reflexo de Bezold-Jarisch e músculo cardíaco; e) segurança em relação à citotoxicidade e mutagenicidade. No entanto, são necessários estudos adicionais com o propósito de investigar a ocorrência de hiperplasia endometrial com uso do fármaco por tempo mais prolongado e, ainda, o mecanismo pelo qual a metiltestosterona modula a resposta do barorreflexo.

5 REFERÊNCIAS

ALDRIGHI, J.M. Indicações atuais da terapêutica hormonal da menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.49, n.4, p.1-7 2003.

ALMEIDA, J.P.M; CARNIDEI, C.; BRANQUINHOI, M.; GERALDESII, F.; ÁGUAS, F. Impact of hormone replacement therapy on body weight. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.33, n.10, p.310-314, 2011.

ANDRADE, T.U.; SANTOS, M.C.S.; BUSATO, V.C.W.; MEDEIROS, A.R.S.; ABREU, G.R.; MOYSÉS, M.R.; BISSOLI, N.S. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarisch reflex control of bradycardia. **Archives of Medical Research**, v.39, p.27-32, 2008.

ANDRADE, T.U.; LOIOLA, L.Z.; ALCURE, S.M.; MEDEIROS, A.R.; SANTOS, M.C.; MOYSÉS, M.R.; ABREU, G.R.; LENZ, D.; BISSOLI, N.S. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone-decanoate-induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.89, n.12, p.891-897, 2011.

BACHMANN, G.; BANCROFT, J.; BRAUNSTEIN, G.; BURGER, H.; DAVIS, S.; DENNERSTEIN, L.; GOLDSTEIN, I.; GUAY, A.; LEIBLUM, S.; LOBO, R.; NOTELOVITZ, M.; ROSEN, R.; SARREL, P.; SHERWIN, B.; SIMON, J.; SIMPSON, E.; SHIFREN, J.; SPARK, R.; TRAISH, A.; PRINCETON. Female androgen insufficiency: the Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. **Fertility and Sterility**, v.77, n.4, p.660-5, 2003.

BASARIA, S.; DOBS, A.S. Clinical Review: Controversies Regarding Transdermal Androgen Therapy in Post menopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.12, p.4743–4752, 2006.

BISSOLI, N.S.; MEDEIROS, A.R.; SANTOS, M.C.; BUSATO, V.C.; JARSKE, R.D.; ABREU, G.R.; MOYSÉS, M.R.; DE ANDRADE, T.U. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacological Research**, v.59, n.6, p.379-384, 2009.

BRAUNSTEIN, G.D. Safety of testosterone treatment in postmenopausal women. **Fertility and Sterility**, v.88, n.1, p.1-17, 2007.

BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.93, n.1, p.43–48, 2005.

BURGER, H.G.; DUDLEY, E.C.; HOPPER, J.L.; SHELLEY, J.M.; GREEN, A.; SMITH, A.; DENNERSTEIN, L.; MORSE, C. The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.80, n.12, p.3537-4, 1995.

CAMINITI, G.; VOLTERRANI, M.; IELLAMO, F.; MARAZZI, G.; MASSARO, R.; MICELI, M.; MAMMI, C.; PIEPOLI, M.; FINI, M.; ROSANO, G.M. Effect of long-acting testosterone treatment on functional exercise capacity, skeletal muscle performance, insulin resistance, and baroreflex sensitivity in elderly patients with chronic heart failure a double-blind, placebo-controlled, randomized study. **Journal of the American College of Cardiology**, v.54, n.10, p.919-927, 2009.

CHUN, J.Y.; MIN, K.S.; KANG, D.I.A. Study Assessing the Quality of Life Related to Voiding Symptoms and Sexual Functions in Menopausal Women. **Korean Journal of Urology**, v.52, n.12, p.858–864, 2011.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

DOBS, A.S.; NGUYEN, T.; PACE, C.; ROBERTS, C.P. Differential Effects of Oral Estrogen versus Oral Estrogen-Androgen Replacement Therapy on Body Composition in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.4, p. 1509–1516, 2002.

DORN, S.B.; BOLT, H.M.; THEVIS, M.; DIEL, P.; DEGEN, G.H. Induction of micronuclei in V79 cells by the anabolic doping steroids tetrahydrogestrinone and trenbolone. **Archives of Toxicology**, v.82, n.4, p.257-63, 2007.

DORN, S.B.; BOLT, H.M.; THEVIS, M.; DIEL, P.; DEGEN, G.H. Micronucleus induction in V79 cells by the anabolic doping steroids desoxymethyltestosterone (madol) and 19-norandrostenedione. **Toxicology Letters**, v.183, n.1-3, p.58-64, 2008.

EL-MAS, M.M.; AFIFY, E.A.; OMAR, A.G.; SHARABI, F.M. Cyclosporine Adversely Affects Baroreflexes via Inhibition of Testosterone Modulation of Cardiac Vagal Control. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.301, n.1, p.346-354, 2002.

FARMACOPÉIA AMERICANA. **Methyltestosterone**. Expert committee monograph development - Pulmonary and Steroids. USP29-NF24, p.1141. Disponível em: <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m53030.html>. Acesso em: 17 de Maio de 2012.

FERNANDES, C.E.; RENNÓ, J.; NAHAS, E.A.P.; MELO, N.R.; FERREIRA, J.A.S.; MACHADO, R.B.; PEIXOTO, S. Síndrome de insuficiência androgênica: critérios diagnósticos e terapêuticos. **Revista de Psiquiatria Clínica [online]**, v.33, n.3, p.152-161, 2006.

FROZARD J.R. Mechanism of the hypotensive effect of Ketanserin. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v.4, p.29-838, 1982.

GEBARA, O.C.E.; VIEIRA, N.W.; MEYER, J.W.; CALICH, A.L.G.; TAI, E.J.; PIERRI, H.; WAJNGARTEN, M.; ALDRIGHI, J.M. Efeitos Cardiovasculares da testosterona. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.79, n.6, p. 644-9, 2002.

HERRINGTON, D.M. Hormone Replacement Therapy and Heart Disease. Replacing Dogma With Data. **Circulation**, v.107, n.11, p.2-4, 2003.

IRIGOYEN, M.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.1, p 55-62, 2001.

JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I.; WALF, A.A.; FRYE, C.A. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. **Physiology & Behavior**, v.99, n.2, p.151-62, 2010.

KEATING, N.L.; CLEARY, P.D.; ROSSI, A.S.; ZASLAVSKY, A.M.; AYANIAN, J.Z. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v.130, n.7, p.545-53, 1999.

KONGNYUY, E.J.; NORMAN, R.J.; FLIGHT, I.H.K.; REES, M.C.P. Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and postmenopausal women: weight and body fat distribution. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, 2000.

LEÃO, L.M.; DUARTE, M.P.; SILVA, D.M.; BAHIA, P.R.; COELI, C.M.; FARIAS, M.L. Influence of methyltestosterone postmenopausal therapy on plasma lipids, inflammatory factors, glucose metabolism and visceral fat: a randomized study. **European Journal of Endocrinology**, v.154, n.1, p.131-9, 2006.

LETHABY, A.; HOGERVORST, E.; RICHARDS, M.; YESUFU, A.; YAFFE, K. Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.12, 2008.

LIMA, G.R.; BACARAT, E.C. **Síndrome do climatério: conceito, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico**. São Paulo: Atheneu, p.253-98, 1995.

LOBO, R.A.; ROSEN, R.C.; YANG, H.M.; BLOCK, B.; VAN DER HOOP, R.G. Comparative effects of oral esterified estrogens with and without methyltestosterone on endocrine profiles and dimensions of sexual function in postmenopausal women with hypoactive sexual desire. **Fertility and Sterility**, v.79, n.6, p.1341-52, 2003.

NESS, R.B.; ALBANO, J.D.; MCTIERNAN, A.; CAULEY, J.A. Influence of estrogen plus testosterone supplementation on breast cancer. **Archives of Internal Medicine**, v.169, n.1, p.41-6, 2009.

PARDINI, D. Mini-revisão: Terapia hormonal da menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.6, 2007.

POLOTSKY, H.N.; POLOTSKY, A.J. Metabolic implications of menopause. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.28, n.5, p. 426-34, 2010.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

SANCHEZ, R.G.; GOMEZ, L.M.S.; CARMONA, L.; FIGULS, M.R.I.; COSP, X.B. Hormone replacement therapy for preventing cardiovascular disease in postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.2, 2005.

SANTORO, N.; BROWN, J.R.; ADEL, T.; SKURNICK, J.H. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.81, n.4, p 1495-1501, 1996.

SHAHIDI, N.T. A review of the chemistry, biological action, and clinical application of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, v.23, n.9, p.1355-90, 2001.

SHERWIN, B.; GELFAND, M. Sex steroids and affect in the surgical menopause: a double-blind, cross-over study. **Psychoneuroendocrinology**, v.10, n.3, p.325-335, 1985.

SOCIEDADE NORTE AMERICANA DE MENOPAUSA. The role of testosterone therapy in postmenopausal women: position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v.12, n.5, p.496-511, 2005.

SOCIEDADE NORTE AMERICANA DE MENOPAUSA; UTIAN, W.H.; ARCHER, D.F.; BACHMANN, G.A.; GALLAGHER, C.; GRODSTEIN, F.; HEIMAN, J.R.; HENDERSON, V.W.; HODIS, H.N.; KARAS, R.H.; LOBO, R.A.; MANSON, J.E.; REID, R.L.; SCHMIDT, P.J.; STUENKEL, C.A. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v.15, n.4 (4 pt 1), p.584-602, 2008.

SOMBOONPORN, W.; DAVIS, S.; SEIF, M.W.; BELL, R. Testosterone for peri- and postmenopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.4, 2005.

SOULES, M.R.; SHERMAN, S.; PARROTT, E.; REBAR, R.; SANTORO, N.; UTIAN, W.; WOODS, N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) **Fertility and Sterility**, v.76, n.5, p.874-8, 2001.

VASQUEZ, E.C. Contribution of the cardiopulmonary reflex to the cardiovascular regulation in normal and pathophysiological states. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, n.4, p.1049-1064, 1994.

VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S.; MAUAD, H.; CABRAL, A.M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.4, p.521-532, 1997.

VILLA, P.; SURIANO, R.; RICCIARDI, L.; TAGLIAFERRI, V.; CICCO, S.; FRANCISCIS, P.; COLACURCI, N.; LANZONE, A. Low-dose estrogen and drospirenone combination: effects on glycoinsulinemic metabolism and other cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. **Fertility and Sterility**, v.95, n.1, p. 158-163, 2011.

WARD, G.R.; ABDEL-RAHMAN, A.A. Effect of testosterone replacement or duration of castration on baroreflex bradycardia in conscious rats. **BMC Pharmacology**, v.5, p.9, 2005.

WARD, G.R.; ABDEL-RAHMAN, A.A. Orchiectomy or androgen receptor blockade attenuates baroreflex-mediated bradycardia in conscious rats. **BMC Pharmacology**, G v.6, p.2, 2006.

WASON, S.; POHLMAYER-ESCH, G.; PALLAN, C.; PALAZZI, X.; ESPUÑA, G.; BARS, R. 17 alfa- Methyltestosterone: 28-day oral toxicity study in the rat based on the "Enhanced OECD Test Guideline 407" to detect endocrine effects. **Toxicology**, v.192, n.2-3, p.119–137, 2003.

YASUI, T.; MATSUI, S.; TANI, A.; KUNIMI, K.; YAMAMOTO, S.; IRAHARA, M. Androgen in postmenopausal women, **The Journal of Medical Investigation**, v.59, n.1-2, 2012.

ZANESCO, A.; ZAROS, P.R. Artigo de Revisão: Exercício Físico e Menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.5, p.254-261, 2009.