UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Detecção de esteróides androgênicos anabólicos por GC/MS em
urina de esportistas e alterações séricas bioquímicas e hormonais

Daniel Rossi de Campos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador(a):
Profa. Dra. Regina Lucia de Moraes Moreau

São Paulo
2004

Daniel Rossi de Campos

Detecção de esteróides androgênicos anabólicos por GC/MS em
urina de sportistas e alterações séricas bioquímicas e hormonais

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lucia de Moraes Moreau
Orientador(a)/presidente

Profa. Dra. Rosângela G. Peccinini Machado
1º. examinador

Dr. Daniel A. Silva Gentil
2º. examinador

São Paulo, 19 de março de 2004.

Não quero rosas, desde que haja rosas.
Quero-as só quando não as possa haver.
Que hei-de fazer das coisas
Que qualquer mão pode colher?

Não quero a noite senão quando a aurora
A fez em ouro e azul se diluir.
O que a minha alma ignora
É isso que quero possuir.

Para quê?... Se o soubesse, não faria
Versos para dizer que inda o não sei.
Tenho a alma pobre e fria ...
Ah, com que esmola a aquecerei?...

(Fernando Pessoa, 1935)

Dedico esse trabalho a meus pais, **Euclides e Abigail**,
que sempre me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

À Karina, **minha namorada, uma pessoa que**
parece frágil, mas é forte ...
... e me faz forte.

AGRADECIMENTOS

À Profa **Dra Regina Lucia de Moraes Moreau**, pela orientação e confiança depositada à minha pessoa para a condução desse trabalho.

À **Dra Janieire Alves e equipe**, pela coordenação de toda etapa clínica desse estudo.

À **Profa. Dra. Elisabeth do Nascimento**, pelas contribuições no Exame de Qualificação e pela correção do Summary.

À **Profa. Dra. Ieda Verreschi**, pela simplicidade e simpatia em suas correções no Exame de Qualificação.

Aos professores da Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pela oportunidade de aprimoramento.

Aos colegas da Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelas risadas e incentivos.

Ao amigo, **Maurício Yonamine**, pelo apoio na etapa analítica e pela oportunidade de trabalhar com um grande pesquisador.

Ao **Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior**, um grande amigo e profissional, que se pode contar a qualquer tempo.

A equipe do LAT, Carmem, Paula, Alessandro, Cris e Ângelo, por tudo que fizeram por mim.

Aos amigos da ANVISA que me respeitam e tornam agradáveis minhas horas de trabalho.

Às amigas, **Dra Isarita Martins e Dra Paula Cerqueira**, pelo apoio no Exame de Qualificação

Ao **Prof. Dr. Aristeu da Rosa**, meu amigo e eterno tutor, que me ensinou a não ter medo do desconhecido e lutar.

À **Profa. Dra. Rosângela G. Peccinini Machado**, minha amiga e incentivadora na área de Toxicologia e Farmacocinética.

Aos meus amigos de São Carlos, em especial ao **Zezo**, pela amizade e companheirismo.

Ao LAT, pelo financiamento que possibilitou a realização desse trabalho.

Aos voluntários que gentilmente participaram desse estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Complexo do Hospital das Clínicas e Instituto do Coração que realizaram as análises dos parâmetros séricos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização desse sonho.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 Definições e Estruturas Químicas	04
2.2 Fisiologia Endócrina: Síntese e Metabolismo da testosterona	10
2.3 Toxicocinética	16
2.4 Toxicodinâmica	19
2.4.1 Efeitos Terapêuticos	20
2.4.2 Efeitos Tóxicos	22
2.5 Padrões de uso e Epidemiologia	29
2.6 Aspectos Legais	32
2.7 Aspectos Analíticos	34
2.7.1 Métodos Analíticos	34
2.7.2 Preparação das amostras	37
2.7.3 Hidrólise Enzimática	39
2.7.4 Métodos de Extração	39
2.7.5 Derivação	40
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO	42/43
4. MATERIAL E MÉTODO	44
4.1 Material	44
4.1.1 Equipamentos e Acessórios	44
4.1.2 Soluções-Padrão	44
4.1.3 Reagentes e Soluções	46
4.1.4 Amostras de Urina	46
4.1.5 Amostras de Sangue	47
4.1.6 Seleção dos voluntários	47
4.1.7 Coleta das amostras	48
4.1.8 Aspectos Éticos	48
4.2 Método	50
4.2.1 Análise das amostras de urina	50
4.2.2 Parâmetros de validação analítica	53
4.2.3 Análise das amostras dos voluntários	58
4.2.4 Análise estatística dos dados laboratoriais	60

5. RESULTADOS	61
5.1 Validação Analítica	61
5.2 Etapa Clínica	72
5.3 Entrevistas	79
5.4 Resultados Analíticos	84
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÕES	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
9. ANEXOS	
Anexo A – Questionário	124
Anexo B – Parecer do CEP	128
Anexo C - TCLE	132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Razão anabólica: androgênica dos principais esteróides anabólicos	08
TABELA 2 – Principais esteróides comercializados no Brasil e no exterior: nomes genéricos, comerciais e vias de administração	09
TABELA 3 – Principais esteróides e seus produtos de biotransformação excretados na urina	38
TABELA 4 – Esteróides anabólicos ou produtos de biotransformação avaliados neste estudo	45
TABELA 5 – Íons monitorados dos esteróides anabólicos derivados com MSTFA pelo modo S.I.M e respectivas abundâncias de acordo com Castilho (2001)	52
TABELA 6 – Equações utilizadas nos cálculos de precisão intra e inter ensaios na etapa de validação do método analítico	56
TABELA 7 – Parâmetros de linearidade de testosterona e epitestosterona	61
TABELA 8 – Exatidão dos dados recalculados em função de cada modelo de regressão (Goodness-of-fit) para testosterona	62
TABELA 9 - Exatidão dos dados recalculados em função de cada modelo de regressão (Goodness-of-fit) para epitestosterona	62
TABELA 10 – Limites de detecção dos esteróides anabólicos avaliados	63
TABELA 11 – Limite de quantificação dos esteróides testosterona e epitestosterona	64
TABELA 12 – Resultados de ensaio de precisão intra-ensaio para cada esteróide anabólico	65
TABELA 13 – Precisão inter-ensaio para os CQ de testosterona	66
TABELA 14 - Precisão inter-ensaio para os CQ de epitestosterona	66
TABELA 15 – Inexatidão intra e inter-ensaios para os CQ de testosterona	67
TABELA 16 - Inexatidão intra e inter-ensaios para os CQ de epitestosterona	67
TABELA 17 – Recuperação dos esteróides anabólicos	68

TABELA 18 – Recuperação de epitestosterona	69
TABELA 19 - Recuperação de testosterona	69
TABELA 20 – Estabilidade dos esteróides anabólicos analisados neste estudo	71
TABELA 21 – Resultados laboratoriais dos parâmetros hormonais para os grupos controle e teste	73
TABELA 22 - Resultados laboratoriais dos perfis lipídicos para os grupos controle e teste	74
TABELA 23 - Resultados laboratoriais dos parâmetros de avaliação hepática e renal para os grupos controle e teste	75
TABELA 24 – Parâmetros de riscos I e II de Castelli (1987) dos usuários de esteróides anabólicos	78
TABELA 25 – Resultados da análise semiquantitativa para fármacos/drogas de abuso dos voluntários usuários de esteróides anabólicos	79
TABELA 26 – Principais dados obtidos por meio do questionário (Anexo A) na fase de inclusão dos voluntários usuários de esteróides	80/81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura molecular da testosterona	05
FIGURA 2 – Estrutura química dos principais esteróides anabólicos	06/07
FIGURA 3 – Controle neuroendócrino da secreção de LH e FSH (BAGATELL;BREMER, 1996)	11
FIGURA 4 – Biossíntese da testosterona	12
FIGURA 5 – Dados populacionais da razão T/E (AYOTTE et al, 1996)	13
FIGURA 6 – Metabolismo da testosterona	14
FIGURA 7 – Mecanismo de ação celular dos esteróides anabólicos	19
FIGURA 8 – Resultados obtidos por Iñigo (2000) e Urhausen (2003) para os níveis plasmáticos de HDL e LDL em usuários crônicos de esteróides anabólicos	24
FIGURA 9 – Resultados dos níveis de LH e FSH séricos de usuários crônicos de esteróides anabólicos estudados por Torres-Calleja (2000) e Urhausen (2003)	26
FIGURA 10 – Processos de separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas de amostras biológicas	35
FIGURA 11 – Estruturas moleculares do esteróide 3-hidroxi- estanozolol: pré e pós derivação com MSTFA	41
FIGURA 12 - Comparação entre os dados de LH e FSH dos voluntários usuários (teste) e não usuários de esteróides anabólicos (controle)	76
FIGURA 13 - Comparação entre os dados de HDL e LDL dos voluntários usuários (teste) e não usuários de esteróides anabólicos (controle)	77
FIGURA 14 – Incidência de uso de esteróides anabólicos pelos voluntários estudados	82
FIGURA 15 – Incidência de uso de fármacos/drogas de abuso pelos voluntários estudados	82
FIGURA 16 – Locais de obtenção dos esteróides anabólicos pelos voluntários estudados	83
FIGURA 17 – Padrões de uso observados nos voluntários incluídos neste estudo	83

FIGURA 18 – Cromatograma de voluntário não usuário de esteróide anabólico	84
FIGURA 19 - Cromatograma de voluntário não usuário de esteróide anabólico	85
FIGURA 20 – Cromatograma da amostra do voluntário 01 analisado por GC/MS	86
FIGURA 21 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	86
FIGURA 22 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	86
FIGURA 23 - Cromatograma da amostra do voluntário 02 analisado por GC/MS	87
FIGURA 24 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	87
FIGURA 25 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	87
FIGURA 26 - Cromatograma da amostra do voluntário 03 analisado por GC/MS	88
FIGURA 27 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	88
FIGURA 28 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	88
FIGURA 29 - Cromatograma da amostra do voluntário 04 analisado por GC/MS	89
FIGURA 30 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	89
FIGURA 31 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	89
FIGURA 32 – Cromatograma padrão das amostras dos voluntários de 01 a 04 e de 07 a 10 analisados por GC/MS (S.I.M)	90
FIGURA 33 - Cromatograma da amostra do voluntário 05 analisado por GC/MS (S.I.M)	90
FIGURA 34 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona	90

FIGURA 35 – Espectro de massas do esteróide endógeno testosterona	91
FIGURA 36 - Cromatograma da amostra do voluntário 06 analisado por GC/MS (S.I.M)	92
FIGURA 37 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona	92
FIGURA 38 – Espectro de massas do esteróide endógeno testosterona	92
FIGURA 39 - Cromatograma da amostra do voluntário 06 analisado por GC/MS (S.I.M)	93
FIGURA 40 – Espectro de massas do esteróide metenolona	93
FIGURA 41 - Cromatograma da amostra do voluntário 07 analisado por GC/MS (S.I.M)	94
FIGURA 42 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	94
FIGURA 43 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	94
FIGURA 44 - Cromatograma da amostra do voluntário 08 analisado por GC/MS (S.I.M)	95
FIGURA 45 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	95
FIGURA 46 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	95
FIGURA 47 - Cromatograma da amostra do voluntário 09 analisado por GC/MS (S.I.M)	96
FIGURA 48 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	96
FIGURA 49 - Espectro de massas do produto de biotransformação 16-beta-hidroxi-estanozolol	96
FIGURA 50 - Cromatograma da amostra do voluntário 10 analisado por GC/MS (S.I.M)	97
FIGURA 51 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona	97
FIGURA 52 – Espectro de massas do esteróide endógeno	

testosterona	97
FIGURA 53 - Cromatograma da amostra do voluntário 10 analisado por GC/MS (S.I.M)	98
FIGURA 54 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3-hidroxi-estanozolol	98

RESUMO

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) é na atualidade a técnica analítica de escolha para a detecção de esteróides androgênicos anabólicos (EAA) em amostras biológicas. Os EAA, apesar de determinarem alterações endócrinas e bioquímicas graves em seus usuários, são amplamente utilizados no âmbito esportivo. O presente trabalho teve como objetivo a validação de um método para a detecção de EAA e/ou seus produtos de biotransformação em urina e avaliação de seus efeitos tóxicos sobre os parâmetros séricos laboratoriais. O estudo foi realizado em 20 voluntários frequentadores de academias da cidade de São Paulo (SP), os quais responderam a um questionário e cederam amostras de urina e sangue. Os dados obtidos dos 10 voluntários usuários de EAA (teste) foram estatisticamente comparados com os de 10 voluntários não usuários (controle). O método analítico validado apresentou-se adequado para a aplicação em programas de controle de dopagem no esporte e os dados séricos demonstraram aumento nos níveis de LDL (178,2 vs 117,6 mg/dL; $p < 0.001$) e queda nos de HDL (13,8 vs 44,6 mg/dL; $p < 0.001$), LH (0,45 vs 2,69 mUI/dL; $p < 0.001$) e FSH (0,67 vs 3,88 mUI/dL; $p < 0.001$) nos voluntários usuários de EAA. Os questionários demonstraram diferentes padrões de uso para os EAA, os quais eram obtidos sem receita médica em farmácias ou em lojas de suplementos alimentares e utilizados em associação com outros fármacos ou drogas de abuso. Os resultados desse trabalho demonstram alterações no perfil lipoprotéico e supressão do eixo hipofisário em usuários crônicos de EAA, além da necessidade da adoção de ações educativas junto à população expostas a tais substâncias.

SUMMARY

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) has been applied as standard analytical method for detection of anabolic steroids (AAS) in biological samples. The AAS have been used extensively in sports, despite of their reported toxicological effects in biochemistry and endocrine profile. The aim of this study was the validation of an analytical method for the detection of AAS and their metabolites in urine samples and evaluation of their effects on blood laboratories parameters. The study was conducted with 20 volunteers of professionally equipped private gym in São Paulo. Urine and blood samples were drawn and a questionnaire was answered. The data from 10 active users of AAS (test group) was statistically compared to 10 nonusers (control group). The optimized method was shown to be suitable for sports antidoping control programs and significant differences were found in laboratory parameters of test group: increase of LDL (178,2 vs 117,6 mg/dL; $p < 0.001$) and reduction in HDL (13,8 vs 44,6 mg/dL; $p < 0.001$), LH (0,45 vs 2,69 mUI/dL; $p < 0.001$) and FSH (0,67 vs 3,88 mUI/dL; $p < 0.001$) serum levels. The questionnaire demonstrated distinct user's profile of AAS, which were bought in drugstores or food supplemental stores and were frequently used in association with other medicines and drugs of abuse. These results indicate that chronic anabolic steroids intakes cause an alteration in serum lipoprotein profile and suppression of the hypothalamus-pituitary gland-gonad axis as well as the necessity of educational programs to people exposed to AAS.

1. INTRODUÇÃO

O uso de fármacos que proporcionam uma melhora do desempenho físico permeia a história da humanidade desde o Período Clássico (antes de Cristo). Os gregos ingeriam cogumelos, pois acreditavam que esses poderiam melhorar o desempenho de atletas em competições. Os gladiadores romanos utilizavam certos estimulantes para atenuar a fadiga. Modernamente há registros de que no século 19, ciclistas europeus utilizavam substâncias ergogênicas como heroína, cocaína e anfetaminas em maratonas e jogos olímpicos. Em 1886, dá-se a primeira fatalidade descrita na história devido ao uso de fármacos que melhoram o desempenho físico: a morte de um ciclista inglês na Maratona Bordeaux-Paris. Em meados de 1935, com o isolamento e a elucidação da estrutura química da testosterona, formas farmacêuticas orais e injetáveis dessa substância e de alguns de seus derivados apresentam-se disponíveis à comunidade biomédica. Assim, a partir da década de 40, estudos com cavalos de corrida, demonstraram uma melhora no desempenho desses animais sob o efeito da testosterona. Na década de 50 e 60, tornam-se comum o uso de esteróides anabólicos e estimulantes por esportistas americanos, soviéticos e alemães em competições olímpicas, como os Jogos Olímpicos de Roma (1960) e Maratonas, como a da França (1965) (KOCH, 2002).

O Comitê Olímpico Internacional (COI), em 1967, estabeleceu sua Comissão Médica, a qual determinou a necessidade de testes laboratoriais para comprovação do uso de estimulantes e narcóticos analgésicos por atletas e definiram como dopagem o uso de qualquer substância endógena ou exógena em quantidades ou vias anormais com a intenção de aumentar o desempenho do atleta em uma competição. O termo dopagem deriva, provavelmente, de um dialeto africano e refere-se a uma bebida estimulante utilizada em cerimônias religiosas. Em 1972 nos Jogos Olímpicos do Munich iniciam-se os testes “formais” para a detecção de drogas e/ou fármacos estimulantes em amostras biológicas; porém, a detecção de esteróides anabólicos exógenos só tem seu início a partir de 1976, nos Jogos Olímpicos de Montreal, pela técnica de radioimunoensaio (RIA). Nos Jogos Olímpicos de Moscou (1980) o RIA é utilizado como método de triagem e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) como

confirmação. A espectrometria de massa (GC-MS) passa a ser utilizada como ferramenta de triagem e confirmação nos Jogos Olímpicos de 1984. Os esteróides anabólicos endógenos, testosterona (T) e epitestosterona (E), começaram a ser analisados a partir de 1988 (Jogos Olímpicos de Seul), por meio da razão T/E desenvolvida por Donike et al. (1983). Razões T/E com valores acima de 6 passaram a ser utilizadas como um parâmetro para demonstrar o possível uso de testosterona exógena pelo atleta (YESALIS et al., 2000).

Na primeira Olimpíada da década de 90 (Barcelona), foram detectadas inúmeras substâncias proibidas em atletas: casos de razão T/E acima de 6 e 10, clenbuterol e estimulantes. A maioria dos atletas sofreu sanções definidas pelo COI (DE LA TORRE, R. et al., 1995). A partir do “Tour de France” (1999) pôde-se observar o início do uso de novas substâncias, como os polipeptídeos recombinantes denominados eritropoietina e hormônio do crescimento (GH). Desde então, técnicas analíticas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de detectar tais polipeptídeos, em níveis anormais, em amostras biológicas de atletas. Assim, os Jogos Olímpicos de Sidney (2000), permitiram a aplicação da técnica de Parissoto et al. (2000), na triagem de amostras de sangue para a detecção de eritropoietina (BOWERS, 2002).

No Brasil, o uso de esteróides anabólicos, substâncias estimulantes e narcóticos é considerado dopagem no esporte segundo os critérios da Portaria 531, de 10 julho de 1985 (Ministério da Educação). A comercialização de tais substâncias é regulamentada pela Portaria 344, de 12 de maio de 1998. Assim, a obtenção de esteróides anabólicos em estabelecimentos farmacêuticos (farmácias e/ou drogarias) somente pode ser realizada por meio de receituário branco em duas vias. Considerando-se o novo Código Civil, a venda de tais substâncias em desacordo com a Portaria citada, deve ser caracterizada como “tráfico de drogas”. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) editou a lei 9.965, de 27 de abril de 2000 que visa restringir, ainda mais, a venda de esteróides e peptídeos anabólicos no território nacional.

As inúmeras federações e confederações esportivas brasileiras definem suas listas de classes de substâncias e métodos proibidos, à luz das diretrizes internacionais; isto determina que os laboratórios especializados no controle

antidopagem no Brasil utilizem técnicas analíticas compatíveis com as sugeridas pelo Comitê Olímpico Internacional.

Esse trabalho pretende validar um método por GC/MS para a detecção de esteróides androgênicos anabólicos em urina de esportistas, bem como identificar as alterações séricas laboratoriais decorrentes desse uso. Paralelamente, também será conhecido o padrão de utilização dos esteróides anabólicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DEFINIÇÕES E ESTRUTURAS QUÍMICAS

O termo esteróide androgênico anabólico, definido pelo “American College of Sports Medicine” (1987), designa substâncias naturais, sintéticas ou semi-sintéticas derivadas da testosterona, capazes de estimular o amadurecimento e a atividade do sistema reprodutor masculino, por meio de sua ação androgênica, assim como proporcionar a síntese de novos tecidos, por meio de sua ação anabólica (YESALIS et al., 2000; LISE et al., 1999).

O esteróide endógeno testosterona teve sua estrutura molecular elucidada em 1935 por Ruzicka e Wettstein (Figura 1), possibilitando o início de estudos que comprovassem sua ação anabólica quando administrada no organismo humano. Porém, esses estudos demonstraram uma extensa metabolização hepática da substância, o que determinava uma meia-vida muito curta. Assim, a partir de modificações na estrutura química da testosterona, com o objetivo de prolongar sua meia-vida plasmática, surgem os derivados semi-sintéticos e sintéticos (SCHANZER, 1996). As principais alterações moleculares no anel peridroxiclofenantreno são:

- Esterificação do grupo hidroxil da posição 17 beta do núcleo esteróide – Neste grupo estão os propionatos, cipionatos, undecanoatos e decanoatos de testosterona. Geralmente, esses fármacos são administrados por via intramuscular (i.m).
- Alquilação da posição 17 alfa do núcleo esteróide – Neste grupo estão a metiltestosterona, fluoximesterona, oxandrolona e oximesterona. Geralmente, esses fármacos são administrados por via oral (p.o).
- Modificações no núcleo esteróide (anéis A, B e C da Figura 1) – Neste grupo estão o danazol, estanozolol e furazabol. Esses fármacos podem ser administrados por via oral (p.o) ou intramuscular (i.m). (KUHN, 2002; SCHÄNZER, 1998).

Além disso, esteróides como o estanozolol e o furazabol apresentam alquilação da posição 17 alfa e alteração estrutural no núcleo esteróide. Outros,

como o clostebol apresentam a adição de um grupo cloro na posição 4 do núcleo esteróide. As estruturas moleculares dos principais esteróides androgênicos sintéticos são apresentadas na Figura 2.

FIGURA 1 – Estrutura molecular da testosterona

ESTERÓIDES ANABÓLICOS ADMINISTRADOS POR VIA ORAL

Metiltestosterona

Oximesterona

Fluoximesterona

Metenolona

Estanozolol

Oxandrolona

FIGURA 2 – Estrutura química dos principais esteróides anabólicos

ESTERÓIDES ANABÓLICOS ADMINISTRADOS POR VIA INTRAMUSCULAR

R = $\text{CO}(\text{CH}_2)_8 \text{CH}_3$ (decanoato)

Nandrolona

R = COCH_2CH_3 (propionato)

R = $\text{CO}(\text{CH}_2)_5 \text{CH}_3$ (enantato)

Testosterona

R = $\text{CO}(\text{CH}_2)_5 \text{CH}_3$ (enantato)

Metenolona

FIGURA 2 (continuação) – Estrutura química dos principais esteróides anabólicos

Entretanto, as modificações estruturais também têm o objetivo de aprimorar as características anabólicas dos derivados da testosterona e se possível atenuar suas afinidades pelos receptores androgênicos. A Tabela 1 apresenta, para alguns esteróides, a razão entre as ações anabólicas e androgênicas (KUHN, 2002; KATZUNG, 2003).

TABELA 1 – Razão anabólica:androgênica dos principais esteróides anabólicos.

Substâncias	Razão anabólica:androgênica
testosterona; metilttestosterona	1:1
fluoximesterona	2:1
metandienona	3:1
oxandrolona	10:1
nandrolona	10:1
estanozolol	30:1

Os esteróides anabólicos sintéticos alquilados na posição 17, administrados geralmente como ésteres, sofrem metabolismo hepático semelhante ao da testosterona, o que determina a formação de 17-ceto-esteróides como produtos de biotransformação. Na fase 1, desse processo de biotransformação, a ligação dupla entre os carbonos 4 e 5 é reduzida, dando origem a compostos isômeros 5-alfa e 5-beta androstano, que posteriormente terão o grupamento cetona da posição 3 do anel A, hidroxilado. Na fase 2 do metabolismo hepático, ocorre a conjugação desses grupos 3-hidroxil, com o ácido glicurônico (KARCH, 1998). Os demais esteróides sintéticos possuem processos de biotransformação mais complexos, que são descritos, em trabalho de revisão, por Schänzer e Donike (1993), e além disso, o sub-ítem 2.3 descreve os principais produtos de biotransformação dos esteróides anabólicos avaliados neste trabalho. A Tabela 2 apresenta os principais esteróides anabólicos comercializados no Brasil e no exterior, seus nomes comerciais e vias de administração.

TABELA 2 – Principais esteróides comercializados no Brasil e no exterior: nomes genéricos, comerciais e vias de administração.

Anabólico Esteróide	Nome Comercial	Via de administração
Cipionato de testosterona*	Deposteron®	i.m
Testosterona*	Androgel®	cutânea
Ésteres de testosterona*	Durateston®, Estrandon P®	i.m
Undecanoato de testosterona*	Androxon®	i.m
Propionato de testoteron	Tesurene®	p.o
Decanoato de nandrolona*	Deca-Durabolin®	i.m
Mesterolona*	Proviron®	p.o
Danazol*	Ladogal®	p.o
Oximetolona*	Hemogenin®	p.o
Metiltestosterona*	Testonus®, Gabecon-M®	p.o
Fluoximesterona**	Halotestin™	p.o
Estanozolol**	Winstrol™	p.o
Estanozolol***	Winstrol V®	i.m
Enantato de Metenolona**	Primobolan™	i.m
Oxandrolona**	Anavar™	p.o
Undecilenato de boldenona***	Equipoise®	i.m

* Esteróides anabólicos comercializados no Brasil; ** Esteróides anabólicos comercializados em outros países; *** Esteróides anabólicos de uso veterinário.

2.2 FISILOGIA ENDÓCRINA: síntese e metabolismo da testosterona

No ser humano, os androgênios são os hormônios responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do aparelho reprodutor masculino. Assim, a testosterona apresenta-se como o principal androgênio secretado pelos testículos. No indivíduo adulto, tal secreção é controlada pelo sistema nervoso central, através da hipófise anterior, que modula a atividade de glândulas endócrinas presentes no sistema reprodutor, por meio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A síntese e o nível plasmático de testosterona é controlado por ação dos hormônios gonadotrópicos da hipófise, os quais são denominados foliculo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O hormônio foliculo-estimulante, que atua nas células de Sertoli, é responsável pela gametogênese e o hormônio luteinizante (ou hormônio de estimulação das células intersticiais – ICSH), que atua nas células intersticiais de Leydig, pela secreção de testosterona (GUYTON, 1988). Além disso, a liberação de FSH e LH é modulada pelo hipotálamo, por meio do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).

Outras substâncias como a prolactina e a inibina atuam na liberação endócrina de testosterona, por meio de um mecanismo denominado: retroalimentação negativa (RANG, 2001). As inter-relações hormonais no controle da secreção de testosterona estão apresentadas na Figura 3.

FIGURA 3 – Controle Neuroendócrino da secreção de LH e FSH (BAGATELL; BREMER, 1996)

(+) = retroalimentação positiva, (-) = retroalimentação negativa, LH = hormônio luteinizante, FSH = hormônio folículo estimulante e GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas.

A testosterona é sintetizada 95% pelos testículos e 5% pelas supra-renais, a partir do colesterol, o qual é biotransformado a desidroepiandrosterona e androstenediona, e posteriormente convertidas a testosterona no tecido hepático. A cada 30 moléculas de testosterona sintetizada forma-se uma molécula de seu isômero, a epitestosterona. Em um homem adulto o nível plasmático de testosterona é de cerca de 0,6 ug/dL. Cerca de 44% da testosterona circulante encontra-se ligada a globulinas ligantes de hormônios sexuais (SHBG) e 54% a albumina (MOTTRAM; GEORGE, 2000; KARILA, 2003). A Figura 4 apresenta a biossíntese da testosterona (MARQUES et al, 2003).

FIGURA 4 – Biossíntese da testosterona

Na urina de um adulto, do sexo masculino, a concentração de testosterona e epitestosterona é praticamente a mesma, permitindo inferir que a razão testosterona/epitestosterona (T/E) seja aproximadamente 1. A Figura 5 mostra dados populacionais da razão T/E obtidos por Ayotte et al. (1996) em um estudo com 3667 atletas.

FIGURA 5 - Dados populacionais da razão T/E obtidos (AYOTTE et al, 1996)

O metabolismo da testosterona ocorre em tecidos periféricos, nos quais é convertida em diidrotestosterona pela enzima 5-alfa-redutase. A diidrotestosterona atua, intracelularmente, como um androgênio ativo. A conversão da testosterona em estradiol, pela aromatase P450, ocorre em tecidos como o adiposo, hepático, células de Leydig e hipotalâmico. O estradiol atua controlando as funções gonadais. Também, no fígado, a testosterona sofre redução da dupla ligação do anel A, o que leva a produção de substâncias inativas (17-ceto-esteróides), como a androsterona e eticolanolona. A principal via de degradação da testosterona nos seres humanos encontra-se ilustrada pela Figura 6 (CASTILHO, 2001; KARILA, 2003).

FIGURA 6 – Metabolismo da testosterona

Além disso, a testosterona, o 5-alfa-diidrotestosterona e o estradiol são responsáveis por alterações anatômicas em indivíduos do sexo masculino em diferentes etapas do desenvolvimento: No período fetal, a testosterona é responsável pela diferenciação e desenvolvimento da vesícula seminal, epidídimo e vasos deferentes; a diidrotestosterona pelo desenvolvimento da próstata, pênis e escroto, e, o estradiol pelo desenvolvimento de estruturas do sistema nervoso central. Já na puberdade, os androgênios são responsáveis pelo crescimento do pênis, tecido escrotal, pêlos corporais e secreção de sebo. No indivíduo adulto, atuam na manutenção das características sexuais secundárias, espermatogênese, hematopoiese e dos tecidos musculares e ósseos, como também nos mecanismos psicofisiológicos do comportamento sexual (WHO, 1992).

2.3 TOXICOCINÉTICA

A toxicocinética utiliza-se de modelos matemáticos para descrever a disposição do xenobióticos administrados ao organismo humano. Assim, parâmetros como absorção, distribuição, metabolismo e excreção são obtidos de estudos que analisam a variação da concentração do xenobiótico em função do tempo. Esses dados são obtidos a partir de métodos analíticos capazes de detectar o fármaco e/ou droga de abuso em amostras biológicas de acordo com a dose utilizada e o período de tempo entre a administração intra ou extravascular e a coleta das amostras (KLAASSEN, 1996)

Descreveremos, brevemente, as principais características toxicocinéticas disponíveis na literatura, para alguns esteróides anabólicos:

- Testosterona – A testosterona é absorvida pela mucosa oral, sistema gastrointestinal e pele, dependendo da forma farmacêutica utilizada. Porém, geralmente é administrada na forma de ésteres pela via intramuscular, para evitar a extenso efeito de primeira passagem. A testosterona encontra-se ligada 98% a proteínas plasmáticas, sendo as principais a albumina e globulina ligante de hormônios esteróides (SHBG). O volume de distribuição encontra-se entre 74.9 e 122.5 L/kg para propionato de testosterona. A testosterona é extensamente metabolizada pelo sistema hepático por enzimas de fase 1, responsáveis pelas 5-alfa e 5-beta reduções do anel peridroiclopentanofenantreno. Os principais produtos de biotransformação são a androsterona, eticolanolona e epiandrosterona, os quais são excretados conjugados na urina, como a testosterona. Aproximadamente 6% da dose é excretada pelas fezes. A meia-vida do éster de testosterona é de 7 a 8 dias (FUJIOKA et al., 1986; JOCKENHOVEL et al., 1996; KARCH, 1998).

- **Metiltestosterona** – A absorção da metiltestosterona ocorre na mucosa oral e no trato gastrointestinal dependendo do tipo de formulação utilizada. A metiltestosterona encontra-se ligada 98% as proteínas plasmáticas e sofre um menor efeito de primeira passagem quando comparado com a testosterona. Aproximadamente 90% da dose é excretada biotransformada pelos rins, e apenas 6% é excretado pelas fezes. A meia-vida de eliminação varia entre 10 e 100 horas (MICROMEDEX, 2003). Os principais produtos de biotransformação são: 17-alfa-metil-5-alfa e 17-alfa-metil-5-beta-androstano-3-alfa-17-beta-diol.
- **Nandrolona** – A nandrolona, por ser administrada pela via intramuscular, apresenta uma biodisponibilidade de 77% da dose. A nandrolona, na forma de éster, é metabolizado pelas enzimas do complexo citocromo P450, responsáveis por processos de oxidação e redução de ligações moleculares, que permitem a formação dos produtos de biotransformação 19-norandrosterona, 19-noreticolanolona e 19-norepiandrosterona. A excreção urinária da nandrolona é de aproximadamente 1,6 L/hr/kg. Tanto o fármaco inalterado quanto os produtos de biotransformação são excretados na urina, ligados a glicuronídeos. A meia-vida de eliminação da nandrolona é de aproximadamente 6 a 8 dias (WIJNAND et al., 1985).
- **Fluoximesterona** – A fluoximesterona é metabolizada 95% pelo sistema hepático, o que determina a formação dos produtos de biotransformação 9-fluor-11-beta-hidroxi-18-nor-17,17-dimetilandrostan-4,13-dien-3-ona, 9-fluor-6-beta-11-beta-17-beta-trihidroxi-17-alfa-metilandrostan-4-ene-3-ona e 9-fluor-17-alfa-androstan-4-ene-3-alfa-6-beta-11-beta-17-beta-tetrol. Somente a fluoximesterona é excretada ligada a glicuronídeos. A meia-vida de eliminação da fluoximesterona é de aproximadamente 9,2 horas (MICROMEDEX, 2003; KARCH, 1998).
- **Metenolona** – A metenolona é metabolizada pelo sistema hepático, principalmente pelas enzimas responsáveis pelas reações de fase 1, determinando a oxidação do grupo hidroxila da posição 17 e hidroxilação dos carbonos 6 e 16. O principal produto de biotransformação formado é o 3-alfa-hidroxi-1-metileno-5-alfa-androstan-17-ona, o qual é excretado

conjugado a glicuronídeos, como a metenolona, na urina (GOUDREAU; MASSE, 1990).

- Estanozolol - O estanozolol é extensamente metabolizado pelo sistema porta-hepático. Os principais produtos de biotransformação são o 3-hidroxi-17-epiestanozolol, 3-hidroxi-estanozolol, 4-beta-hidroxi-estanozolol e 16-beta-hidroxi-estanozolol, dos quais somente o primeiro não é excretado conjugado na urina (WILSON, 1996; KARCH, 1998).
- Oxandrolona – A oxandrolona possui alta biodisponibilidade ao ser administrada pela via oral. Apresenta uma alta afinidade por proteínas plasmáticas (94-98%). A oxandrolona, ao contrário de outros esteróides, apresenta adequada estabilidade metabólica, devido ao grupo lactona presente em sua estrutura molecular. Assim, a principal via de excreção desse esteróide é a via urinária, responsável por 60% da depuração. Entretanto, os principais produtos de biotransformação são o 17-epioxandrolona e o 18-nor-17,17-dimetil-oxandrolona que, possivelmente, são seqüestrados por tecidos, visto que não são detectados em amostras de urina. A meia-vida de eliminação da oxandrolona é de 5 a 13 horas (KARIM et al., 1973).

2.4 TOXICODINÂMICA

A testosterona e esteróides androgênicos anabólicos sintéticos atuam, em doses terapêuticas, sobre o organismo humano, ligando-se a receptores de esteróides presentes no citoplasma das células. Esse complexo formado, esteróide-receptor, é translocado para o núcleo, onde se liga ao DNA, permitindo a transcrição de RNA mensageiro. Os RNA mensageiros determinam a síntese de proteínas, as quais caracterizam a ação anabólica de tais substâncias (JULIEN, 1997). A Figura 7 ilustra a ação dos esteróides sobre as células humanas.

FIGURA 7 – Mecanismo de ação celular dos esteróides anabólicos
(<http://www.anselm.edu/homepage/jpitoloch/genbio/endocrinenot.html>)

Um outro mecanismo de ação para os esteróides anabólicos em doses supra-terapêuticas, denominado “mecanismo supra-fisiológico”, é apresentado por Mottram e George (2000) e Karila (2003). Esse modelo propõe que altas concentrações de esteróides anabólicos competiriam com os glicocorticóides, que são substâncias responsáveis pelo catabolismo protéico, pelos receptores de glicocorticóides. Deste modo, a alta concentração plasmática de esteróides anabólicos deslocaria os glicocorticóides de seus receptores, diminuindo o catabolismo protéico (WHO, 1992).

Os esteróides derivados da testosterona são utilizados extensamente por atletas e esportistas em dose supra-terapêuticas, por apresentarem efeito trófico sobre a musculatura estriada, apesar de determinarem efeitos adversos sobre os sistemas cardiovascular, endócrino, hepático e o comportamento. Contudo, o efeito positivo sobre o balanço de nitrogênio, permite o uso clínico de tais substâncias no tratamento de caquexia, devido a estados catabólicos decorrentes de traumas e cirurgias. (KATZUNG, 2001; JULIEN, 1997).

2.4.1 Efeitos Terapêuticos

Os esteróides anabólicos são utilizados em doses terapêuticas, na manutenção de pacientes com doenças crônicas. Alguns desses usos clínicos estão sucintamente descritos abaixo:

- Hipogonadismo – A testosterona e seus ésteres são utilizados para aumentar a secreção endógena de androgênios em homens hipogonadais. As principais preparações utilizadas são as contendo propionato de testosterona, cipionato de testosterona, enantato de testosterona, metiltestosterona e fluoximesterona (KATZUNG, 2003).
- Distúrbios Ginecológicos – Alguns esteróides, como o danazol, são utilizados no tratamento de endometriose. Além disso, algumas vezes os esteróides podem ser administrados em combinação com estrogênios na terapia de reposição hormonal (KATZUNG, 2003).

- Infertilidade – A testosterona pode ser utilizada para bloquear a atividade gonadal em homens durante terapia antineoplásica (MICROMEDEX, 2003).
- Retardo puberal – O enantato de testosterona é utilizado, por via intramuscular, em garotos com puberdade tardia e baixa estatura. Também podem ser utilizados o undecilato de testosterona e oxandrolona, por via oral (MICROMEDEX, 2003).
- Osteoporose – Os esteróides anabólicos tem sido utilizados isoladamente ou em combinação com estrogênios com o objetivo de diminuir a reabsorção óssea (KATZUNG, 2003).
- Artrite Reumatóide – O uso de esteróides anabólicos na terapia da artrite reumatóide, permite queda no nível sérico do fator reumatóide (IgM). São utilizados, geralmente, ésteres de testosterona como o undecilato de testosterona (CUTOLO, 1991).
- Estados de caquexia – Os esteróides anabólicos são utilizados em situações de balanço energético negativo, como na manutenção de pacientes portadores de AIDS, em terapia antineoplásica, doença pulmonar obstrutiva crônica, queimaduras de grande extensão, insuficiência renal e pós-operatório, visto que esses pacientes apresentam intensa perda de peso e baixa capacidade de manutenção protéica. Geralmente, são utilizados ésteres de testosterona. Entretanto, trabalhos da literatura demonstram o uso de nandrolona, oxandrolona e estanozolol na terapia dessas doenças, respectivamente, apresentados por Schols et al. (1995), Ferreira et al. (1998) e Spunger et al. (1999).

2.4.2 Efeitos Tóxicos:

A utilização de doses supra-terapêuticas de esteróides anabólicos determina uma grande incidência de eventos adversos em seus usuários. Esses eventos envolvem alguns tecidos, como o cardiovascular, hepático e endócrino. Esses efeitos tóxicos serão descritos à luz da literatura médica nos itens abaixo:

- Efeitos Tóxicos sobre o Sistema Cardiovascular:

- Infarto do Miocárdio – Kennedy e Laurence (1993) e Lucke et al. (1990) descrevem casos clínicos de infarto do miocárdio de esportistas que utilizavam esteróides anabólicos. Um estudo epidemiológico desenvolvido por Ansell et al. (1993) demonstrou que usuários de esteróides anabólicos apresentam evidências de hipercoagulação. O estudo de Matsuda et al. (1993) corrobora com os dados de Ansell et al. (1993), demonstrando o aumento da expressão de Tromboxano A₂ e agregação plaquetária em usuários de testosterona. Esses estudos sugerem que a hipercoagulação seja uma das causas de infarto do miocárdio. Além disso, fatores como a hipertensão arterial descritos por Bolding et al (2002) e alterações nos perfis lipoprotéicos, associados à aterosclerose (LUSIS, 2000), determinam o aumento do risco de eventos cardiovasculares graves, como o infarto do miocárdio, a usuários crônicos de esteróides anabólicos.
- Hipertensão – Estudos de Messerli e Frohlich (1979), foram os primeiros a sugerirem a correlação entre o uso de esteróides anabólicos e o desenvolvimento de hipertensão arterial. Bolding et al. (2002), em um estudo epidemiológico com 772 usuários de esteróides na Inglaterra, demonstraram que 19% dos entrevistados narraram como principal efeito adverso ao uso crônico de anabolizantes, o desenvolvimento de hipertensão arterial. O mecanismo responsável por tal alteração da pressão arterial ainda é muito discutido na literatura, porém Kutscher et al. (2002) sugerem

que tal alteração seja devido ao aumento na retenção de líquidos e aumento do volume plasmático.

- Hiperlipidemia – A redução nos níveis de HDL-c em usuários de esteróides anabólicos foi demonstrado, pela primeira vez, por Furman em 1957 em esportistas que faziam uso de metiltestosterona. Friedl et al. (1990) e Thompson et al. (1989) demonstraram os efeitos de alguns esteróides anabólicos sobre o níveis plasmáticos da lipoproteína de alto peso molecular (HDL-c). O mecanismo bioquímico responsável pela queda nos níveis de HDL-c, quando do uso de esteróides anabólicos, envolvem a estimulação da enzima hepática denominada, triglicerol lipase hepática (HTGL) (KANTOR et al., 1985), responsável pelo catabolismo fisiológico do HDL-c (EISENBERG, 1984) e a inibição da síntese da apoproteína apoA-I (HAZZARD et al., 1984). Glader e Suchman (1994) demonstraram uma maior atividade da enzima HTGL em indivíduos que utilizaram esteróides anabólicos administrados por via oral (ex: estanozolol) em relação aos que utilizavam os administrados por via intramuscular, como os ésteres de testosterona e nandrolona. Dados inversos são descritos para a lipoproteína de baixo peso molecular (LDL-c). O mecanismo bioquímico responsável pelo aumento nos níveis de LDL-c, quando do uso de esteróides anabólicos, envolve o aumento da atividade da lipase hepática, responsável pela transformação de VLDL a LDL e a supressão do catabolismo de LDL (SHEPHERD, 1995). Thompson et al. (1989) demonstraram que usuários de esteróides anabólicos 17-alfa-alquilados, os quais são administrados por via oral, apresentam níveis séricos de LDL-c mais elevados do que usuários de esteróides anabólicos administrados por via parenteral, como os ésteres de testosterona. Entretanto, estudos como o de Cohen et al. (1986) não demonstram aumento nos níveis de colesterol total em usuários de esteróides anabólicos, talvez devido às alterações antagônicas nos níveis séricos de HDL-c e LDL-c.

A Figura 8 mostra os resultados obtidos por Iñigo et al. (2000) e Urhausen et al. (2003) para os níveis plasmáticos de HDL e LDL em usuários crônicos de esteróides anabólicos.

FIGURA 8 - Resultados obtidos por Iñigo et al. (2000) e Urhausen et al. (2003) para os níveis plasmáticos de HDL e LDL em usuários crônicos de esteróides anabólicos.

O aumento da razão LDL/HDL determina o aumento do risco de eventos vasculares em indivíduos usuários de esteróides anabólicos. Sabe-se que o alto nível sérico de LDL-c e o baixo nível sérico de HDL-c estão associados à ocorrência de aterosclerose. A lipoproteína LDL-c, nessas condições, permeia o epitélio vascular e aloja-se na camada íntima, onde sofre oxidação e ativa o processo inflamatório, que evolui para a formação de macrófagos ricos em colesterol ("foam-cells"), placa fibrótica e trombo (LUSIS,2000;LIBBY,2002).

○ Efeitos Tóxicos sobre o Sistema Endócrino:

- Glicemia – Landon et al. (1962) e Woodard et al. (1981) descrevem a diminuição da tolerância à glicose em atletas usuários, respectivamente, de metandienona e oximetolona.
- Sistema Reprodutivo – No homem, os esteróides anabólicos determinam uma supressão dose-dependente nos níveis séricos de LH e FSH, por inibirem o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (MACINDOE et al., 1997). Desta forma, como os hormônios LH e FSH são fisiologicamente necessários na gênese e na atividade dos espermatozóides, Holma (1977) descreve a diminuição no volume espermático, número de espermatozóides, motilidade, além de alterações na morfologia e diminuição da libido em usuários de esteróides anabólicos. Porém, o hipogonadismo se mostrou reversível após 4 meses da descontinuação do uso de esteróides de acordo com o estudo de MacIndoe et al. (1997). A Figura 9 mostra os resultados dos níveis de LH e FSH séricos de usuários crônicos de esteróides anabólicos estudados por Torres-Calleja et al. (2000) e Urhausen et al. (2003).

(Torres-Calleja et al.,2000) (Urhausen et al.,2003)

FIGURA 9 - Resultados dos níveis de LH e FSH séricos de usuários crônicos de esteróides anabólicos estudados por Torres-Calleja et al. (2000) e Urhausen et al. (2003).

Em alguns indivíduos, o uso de doses supra-fisiológicas de testosterona permite a formação de estradiol, por meio de uma reação enzimática denominada aromatização. O estradiol proporciona o desenvolvimento do tecido mamário em indivíduos adultos, levando a uma alteração anatômica, denominada ginecomastia. Assim, alguns atletas que fazem uso de ésteres de testosterona, utilizam preventivamente de tamoxifeno, um agente antiestrogênico (DE LUIS et al., 2001).

- Tireóide – Alen et al. (1987) descrevem a supressão dos níveis séricos de tiroxina, triiodotironina e tiroxina livre em usuários de esteróides anabólicos.

- Efeito Tóxico sobre o Sistema Hepático:

- Elevação nos níveis de aminotransferases – O uso de esteróides anabólicos 17 alfa-alquilados determina elevações nos níveis séricos de ALT e AST. Entretanto, com a descontinuação do uso desses esteróides, obtém-se a reversão desse quadro. Os usos de ésteres de testosterona e nandrolona não estão associados a efeitos sobre as aminotransferases hepáticas (WELDER et al., 1995), porém a literatura descreve casos clínicos de colestases associadas ao uso de proprionato de testosterona e metiltestosterona (YESALIS et al., 2000).
- Tumores hepáticos – Overly et al. (1984) descrevem casos de carcinoma metastático e adenomas hemorrágicos em usuários crônicos de esteróides anabólicos. Entretanto, Ingerowski et al. (1981) não demonstrou a atividade mutagênica dos esteróides por meio de testes *in-vitro*. Lesna e Taylor (1986) demonstraram que animais submetidos a doses elevadas de decanoato de nandrolona (600mg/kg/semana) por 6 semanas, não apresentaram dados histológicos que evidenciavam a formação de tumores hepáticos. Porém, a exposição desses animais a dimetilnitrosamina, um conhecido promotor carcinogênico, determinou a formação de tumores no tecido hepático, permitindo inferir que os esteróides anabólicos possuem uma ação indutora, em doses 400 a 600 vezes da utilizada na terapêutica.

○ Efeito Tóxico sobre o Comportamento:

- Síndromes maníaco/depressivas – Estudos descrevem o desenvolvimento de sintomatologia depressiva e/ou paranóica em usuários de esteróides anabólicos androgênicos. Bahrke et al. (1996) demonstraram em um estudo que 70% dos usuários de esteróides analisados apresentaram sintomas paranóicos, além de hipomania e depressão após a descontinuação do uso. As caracterizações das sintomatologias foram realizadas por meio do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais da Associação Americana de Psiquiatria - DSM-III-R (1997). Esse manual apresenta critérios padronizados internacionalmente para caracterização, classificação e diagnósticos clínicos de doenças psiquiátricas (YESALIS et al., 2000).
- Comportamento Agressivo – Bahrke et al. (1996) demonstraram correlação entre os níveis séricos de testosterona e agressividade em usuários de esteróides. Trabalhos como os de Thiblin et al. (2000) correlacionam o uso de esteróides anabólicos a crimes violentos, como assassinatos e suicídios, devido a alucinações e delírios.
- Dependência – Utilizando os critérios do DSM-III-R (1997) para caracterização de dependência, Brower et al. (1991) em um estudo com 49 usuários de esteróides, observa a presença de pelo menos 1 desses critérios em 94% dos indivíduos, como também 3 ou mais desses critérios em 57% dos entrevistados. Os principais critérios relacionados à dependência, pelo DSM-III-R, são a permanente insatisfação com o padrão físico e sintomas de depressão, fadiga e cefaléia após a descontinuação do uso de substâncias que determinem reforço positivo, como é o caso dos esteróides anabólicos (PÄRSSINEN;SEPPALA, 2002).

2.5 PADRÕES DE USO E EPIDEMIOLOGIA

Estudos clínicos, desde a década de 70, tentam demonstrar que o uso de esteróides anabólicos determina o aumento da força muscular. Hervey (1976) demonstrou que atletas que fizeram uso de 100mg de metandienona/dia, durante seis semanas, apresentaram aumento da massa magra (tecido muscular) e tamanho da musculatura. Entretanto, avaliações sobre a força e desempenho musculares não foram diferentes, quando comparado ao grupo placebo. O “American College of Sports Medicine” define que programas de treinamento associados aos padrões nutricionais adequados, permitem aumento de peso corporal, devido à expansão do compartimento da massa magra. Desta forma, os dados obtidos por Hervey et al. (1976) devem-se provavelmente ao aumento intracelular de fluidos de acordo com o “Council on Scientific Affairs” de 1988 (Alén,1988). Outros estudos, como o de Bhasin et al. (1996), demonstraram hipertrofia e o aumento de força muscular em atletas, que fizeram uso de 600 mg de testosterona/dia por 10 semanas, em relação ao grupo controle.

Assim, há mais de 30 anos, atletas utilizam os esteróides anabólicos, em diferentes padrões de uso, com o objetivo de aumentar a massa e a força muscular, a resistência da musculatura a treinamentos de alta intensidade e diminuir os valores de gordura corpórea. Dados clássicos da literatura demonstram que os esteróides são utilizados por atletas, obedecendo, basicamente, 3 padrões: o primeiro, conhecido como ciclo, no qual o atleta utiliza o agente anabólico em episódios intercalados, por períodos de 4 a 12 semanas; o segundo, denominado pirâmide, no qual o atleta começa o uso do esteróide com doses baixas, as quais são aumentadas progressivamente até atingir uma dosagem máxima estabelecida e posterior reduções regressivas da dose até valores iniciais; e a terceira, conhecida como empilhamento (stacking), que se refere à utilização de vários esteróides em um mesmo período de uso, com a finalidade de obter resultados mais rápidos, devido à ação sinérgica dos esteróides (SILVA et al., 2002).

Entretanto, somente a realização de programas de repressão ao uso de dopagem no esporte, como os apresentados pelos Estados Unidos desde a década de 70 (YESALIS et al, 2000) e o desenvolvimento de trabalhos científicos, sob a óptica epidemiológica, é que permitiram o conhecimento dos padrões de uso de esteróides anabólicos no Brasil e no mundo.

Kanayama et al. (2001), demonstraram que, na atualidade, podem existir mais de 1,5 milhões de usuários de esteróides anabólicos freqüentando academias nos Estados Unidos. Além disso, dados do “Youth Risk and Behavior Surveillance System” (E.U.A) de 1995, estimou que aproximadamente 375.000 adolescentes do sexo masculino e 175.000 do sexo feminino, de escolas norte-americanas públicas e privadas, fizeram uso de esteróides ao menos uma vez na vida. Em um estudo conduzido por Green et al. (2001) com 13.914 atletas australianos, evidenciou-se que 1,1% faziam uso de esteróides e que 3,8% dos usuários obtiveram o agente anabólico por meio de treinadores, 20,8% por colegas da equipe esportiva, 38% por prescrição médica e 11,3% por outras fontes. Além disso, Kindlundh et al. (1999) e Wichstrom e Pederson (2001) observaram que o uso de anabolizantes por adolescentes estava relacionado ao consumo de drogas psicotrópicas, como o tabaco e álcool, e ilícitas, como a maconha, visto que tais substâncias são utilizadas com freqüência, por jovens, no ambiente social. No Brasil, poucos trabalhos apresentam dados sobre o uso de substâncias proibidas no âmbito esportivo, principalmente sobre esteróides anabólicos. Porém, Conceição et al. (1999) realizaram um estudo com praticantes de musculação em academias de Porto Alegre, demonstrando que 24,3% dos indivíduos estudados utilizavam esteróides, os quais foram obtidos através de: prescrição médica para 4%, treinadores para 9%, amigos para 19% e indicação de outros atletas para 34%. Neste mesmo estudo, observou-se que os esteróides anabólicos mais utilizados foram nandrolona (37%), estanozolol (21%) e ésteres de testosterona (18%) e que 35% dos usuários já haviam experimentado sintomas de dependência e alterações de humor. Da Silva et al. (2001), em um estudo piloto com 36 atletas profissionais e recreacionais de academias de Porto Alegre, demonstraram que 95% dos entrevistados estavam usando ou já haviam utilizado esteróides pelo menos uma vez na vida.

Estudos de Iriart e Andrade (2002) e Cazenave e Wagner (2003), respectivamente, em Salvador (BA) em Campinas (SP), por meio de entrevistas a freqüentadores de academias, demonstraram a falta de informação dos usuários de esteróides sobre seus possíveis danos ao organismo, bem como a necessidade do desenvolvimento de programas nacionais, culturalmente apropriados, de informação e prevenção do uso de esteróides anabólicos androgênicos.

2.6 ASPECTOS LEGAIS

Em 1967, o Comitê Olímpico Internacional (C.O.I) estabeleceu uma Comissão Médica com o objetivo de iniciar o controle da dopagem no esporte. Esse fato permitiu que nos Jogos de Inverno de Grenoble (1968) e nas Olimpíadas da cidade do México tal substâncias ergogênicas fossem proibidas. Assim, para orientar as Associações e Federações Esportivas Internacionais foi lançada uma lista das substâncias e métodos proibidos, como um anexo do Código Antidoping do Movimento Olímpico. Essa listagem é editada anualmente pelo C.O.I, e a partir de 2004, será preparada em conjunto com a Agência Mundial Antidoping (WADA). (COB, 2003)

A lista, publicada em 2003, como a anterior, no item c) de “Classes de substâncias proibidas” estabelece a lista dos esteróides anabólicos exógenos proibidos em competições Olímpicas, bem como dos esteróides anabólicos endógenos, como a testosterona e seus precursores. Além disso, estabelece que a presença da razão T/E maior que 6 evidencia o possível uso de ésteres de testosterona. Contudo, sugere investigações sobre as condições fisiológicas e/ou patológicas dos atletas, por meio de dados séricos laboratoriais, em especial endócrinos, para a confirmação de tal fato.

A partir de 2003, a listagem de substâncias e métodos proibidos apresenta como item f), a proibição do uso de agentes antiestrogênicas por atletas do sexo masculino, como clomifeno, ciclofenil, tamoxifeno e inibidores de aromatase. No item g) define que a presença de concentrações urinárias acima de 200 ng/mL para epitestosterona constitui dopagem, visto que tal substância pode ser sido usada para “mascarar” a razão T/E em usuários de ésteres de testosterona.

No artigo IV da listagem há um sumário de valores de “cut-off” para determinados agentes ergogênicos, citando novamente o valor de 200 ng/mL para epitestosterona e apresentando os valores de 2 e 5 ng/mL de 19-norandrosterona, respectivamente, para homens e mulheres (C.O.I, 2003)

No Brasil, as diversas federações esportivas e o Comitê Olímpico Brasileiro (COB) possuem listas de substâncias e métodos proibidos baseados na listagem anual do C.O.I./WADA.

2.7 ASPECTOS ANALÍTICOS

2.7.1 Métodos analíticos

- Radioimunoensaio

Inicialmente a detecção de esteróides anabólicos em amostras de urina com a finalidade de controle de dopagem no esporte foi realizada utilizando-se a técnica do radioimunoensaio (RIA), a qual tem como princípio básico à utilização de anticorpos específicos para detecção de cada esteróide anabólico. Em 1979, Brooks desenvolveu inúmeros métodos de RIA para a detecção de 19 nortestosterona e 17-alfa esteróides em amostras biológicas. Nos Jogos Olímpicos de Montreal (1976), o RIA foi utilizado como método oficial para a detecção de esteróides anabólicos androgênicos. Entretanto, como o RIA se mostrou um método inespecífico, já que não permitia a distinção entre esteróides anabólicos com estruturas moleculares semelhantes, em 1980 nos Jogos Olímpicos de Moscou, esse método passou a ser utilizado como uma ferramenta de triagem e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), surge como o método oficial de confirmação (YESALIS,2000).

Na atualidade, o RIA e demais imunoensaios são utilizados na rotina laboratorial em Dopagem no Esporte como método de triagem para drogas ilícitas como, a maconha, cocaína, anfetaminas e opióides, devido ao seu baixo custo operacional quando comparado ao GC-MS.

- Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A GC-MS apresenta-se como a técnica de escolha na detecção e quantificação de esteróides anabólicos em amostras biológicas. Desde as Olimpíadas de Atlanta (1996) a espectrometria de massas é utilizada como método de triagem e confirmação do uso de agentes anabólicos por atletas (BOWERS,1997).

Esse equipamento apresenta uma combinação sinérgica de duas técnicas analíticas: a cromatografia gasosa que realiza a separação dos componentes presentes na matriz biológica e a espectrometria de massas que fornece informações sobre as características estruturais de cada componente, por meio da abundância de cada íon (m/z) gerado (KITSON et al.,1996). A Figura 10 esquematiza os processos de separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas de amostras biológicas.

FIGURA 10 - Processos de separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas de amostras biológicas.

Chung et al. (1990) descreveram um método de detecção de esteróides anabólicos utilizando a GC-MS de baixa resolução, o qual utilizava na cromatografia uma coluna capilar de metilfenilsilicone 5% (17m, 0.2mm, 0.33 μ m), programação do forno com temperatura inicial de 180°C e final de 300°C e modo de injeção “splitless”. O espectrômetro de massas foi operado no modo S.I.M, monitorando-se 3 íons, bem como a ionização da amostra ocorreu por impacto de elétrons. Outros autores como Ayotte et al. (1996) e Özer e Temizer (1997) também apresentaram métodos para análise de esteróides utilizando GC-MS de baixa resolução ($R^*=500$). Entretanto, como as técnicas analíticas para o controle do uso de esteróides necessitam de constantes pesquisas e inovações, em 1996, Horning, do Laboratório credenciado pelo C.O.I de Cologne introduziu a técnica da GC-MS de alta resolução (HRMS) a rotina de controle da dopagem. Essa técnica permitiu uma maior sensibilidade ($R^*=5000$) na detecção de produtos de biotransformação de esteróides, já que a presença de interferentes com estruturas moleculares semelhantes aos dos esteróides anabólicos exógenos na urina é um fato comum. Além disso, a introdução da GC-MS-MS, “tandem mass” e “ion trap” (Gambelunghe,2002) ou “MS-TOF” permitiram significativas vantagens na identificação de esteróides exógenos, enquanto que a GC-HRMS e a separação isotópica C^{12}/C^{13} , na verificação do uso de esteróides endógenos, como a testosterona e a epitestosterona (AGUILERA et al.,1996).

2.7.2 Preparação das amostras

Amostra

A urina é a amostra de escolha para a verificação de esteróides anabólicos na rotina laboratorial, visto que se apresenta como um método de coleta não invasivo, quando comparada com o sangue, além de permitir a obtenção de um grande volume de amostra. Considera-se também que a maioria dos esteróides é extensamente metabolizado e conjugado com grupos glicurônicos, os quais são excretados na urina (YESALIS, 2000). A Tabela 3 mostra os principais esteróides e seus produtos de biotransformação excretados na urina. Alguns esteróides são eliminados inalterados em grande quantidade, como a oxandrolona, e em baixa quantidade, como o estanozolol (SCHÄNZER, 1998). Porém, outras matrizes biológicas vêm sendo estudadas como novas possibilidades para a verificação do uso recente e a longo prazo de esteróides por atletas. Destacam-se os estudos com amostras de sangue para a detecção de ésteres de testosterona desenvolvido por De La Torre, X et al. (1995) e em cabelo por Kintz et al. (1999).

TABELA 3 - Principais esteróides anabólicos e seus produtos de biotransformação excretados na urina.

Principais esteróides anabólicos exógenos	Principais substâncias excretadas na urina (substância inalterada e/ou produtos de biotransformação)
Noretandrolona	17-alfa-etil-5-beta-estrano-3-alfa-17-beta-triol
Fluoximesterona	9-alfa-fluoro-17-alfa-metil-4-androsteno-3-alfa-6-beta-11-beta-tetraol 6-beta-hidroxifluoximesterona 9-alfa-fluoro-17-alfa-metil-5-beta-androstano-3-alfa-11-beta-17-beta-triol
Metenolona	Metenolona 3-alfa-hidroxi-1-metileno-5-alfa-androstano-17-ona
Nandrolona	19-norandrosterona 19-noreticolanolona 19-norepiandrosterona
Oxandrolona	Oxandrolona 17-epioxandrolona
Estanozolol	3-hidroxi-estanozolol 4-beta-hidroxi-estanozolol 16-beta-hidroxi-estanozolol 4-beta-16-beta-dihidroxi-estanozolol
Metiltestosterona	17-alfa-metil-5-alfa-androstano-3-alfa-17-beta-diol 17-beta-metil-5-alfa-androstano-3-alfa-17-alfa-diol 17-alfa-metil-5-beta-androstano-3-alfa-17-beta-diol 17-beta-metil-5-beta-androstano-3-alfa-17-alfa-diol

2.7.3 Hidrólise enzimática

Como a maioria dos esteróides anabólicos e/ou seus produtos de biotransformação são excretados conjugados ao ácido glicurônico na urina, faz-se necessário proceder à hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima Beta-Glucuronidase de *Escherichia coli* ou *Helix pomatia*. Quando se pretende realizar uma extração líquido-líquido, a hidrólise enzimática deve ter sido feita previamente, devido às características hidrofílicas dos compostos em questão. Quando se utiliza extração em fase sólida, a hidrólise enzimática apresenta-se como uma etapa posterior (SCHÄNZER, 1998).

2.7.4 Métodos de Extração

Extração líquido-líquido

Na extração líquido-líquido, o solvente orgânico mais utilizado é o dietil éter. Porém, devido à sua alta volatilidade e necessidade periódica de destilação para eliminação de peróxidos, o terc-butil-metil éter vêm sendo utilizado, visto que não permite a formação de peróxidos e possui semelhante capacidade extratora (SCHÄNZER, 1998). Além disso, esse modo de extração deve ocorrer em pH alcalino, em torno de 9 a 10, já que em pH superiores os esteróides oxandrolona e o produto de biotransformação do estanozolol, o 3-hidroxi-estanozolol, não são extraídos (SCHÄNZER, 1998).

Extração em fase sólida

Esse modo de extração permite o isolamento de esteróides conjugados da matriz biológica. A resina XAD-2 e Sep-Pak C18 são as mais utilizadas. Trabalhos como os de Özer e Temizer (1997) utilizam a resina XAD-2 para a extração de nandrolona de amostras de urina e Yoon e Lee (2001) na extração de clostebol, oximesterona e oximetolona.

2.7.5 Derivação

A derivação tem como objetivo aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade de compostos que serão analisados pela técnica da cromatografia gasosa (GC) e/ou acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Essa reação pode ocorrer por silinização, acilação e alquilação de grupamentos polares da molécula a ser analisada. Desta forma, os esteróides anabólicos por possuírem em sua estrutura molecular, grupos hidroxila e ceto-ácidos, se não derivados, apresentam uma baixa resolução quando analisados pela GC-MS (SEGURA et al., 1998). O agente de derivação mais utilizado, no caso dos esteróides anabólicos, é o n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), introduzido por Donike em 1969 (SCHÄNZER, 1998). Esse agente, possui a vantagem de poder ser utilizado como solvente e assim ser introduzido diretamente no GC/MS. Entretanto, o uso somente de MSTFA não é efetivo na silinização de esteróides que possuem 17-beta-hidroxi-grupos. Desta forma, é necessário o uso de iodeto de amônia na constituição da solução MSTFA/NH₄I, o que permite a formação efetiva de grupos trimetilsilil (TMS) nestes esteróides. Além disso, a adição de um agente redutor, como etanotiol evita a formação de iodeto sob a ação da luz, estabilizando a solução MSTFA/NH₄I (SEGURA et al., 1998; SCHÄNZER, 1998). A figura 11 mostra as estruturas moleculares do esteróide 3-hidroxi-estanozolol pré e pós derivação por MSTFA.

3'HIDROXIESTANOZOLOL

(I)

3'HIDROXIESTANOZOLOL

(II)

FIGURA 11 – Estruturas moleculares do esteróide 3-hidroxi-estanozolol: pré (I) e pós (II) derivação com MSTFA.

3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Validação de método analítico por GC-MS para a detecção de esteróides androgênicos anabólicos em amostras de urina de esportistas;
- Avaliar as alterações bioquímicas e hormonais séricas de voluntários usuários crônicos de esteróides anabólicos quando comparados com não usuários;
- Conhecer o padrão de uso dos esteróides anabólicos pelos participantes desse estudo;

Para que tais objetivos pudessem ser contemplados, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Pesquisa bibliográfica de técnicas analíticas utilizadas por laboratórios oficiais do C.O.I para a detecção de esteróides anabólicos em amostras de urina e de estudos clínicos que avaliassem os efeitos tóxicos de tais substâncias sobre os sistemas cardiovascular, hepático, endócrino e nervoso;
- Validação de técnica cromatográfica por GC-MS para detecção de esteróides anabólicos em amostras de urina;
- Submissão de protocolo do estudo ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do InCor – HCFM/USP;

- Aplicação do método validado em amostras de urina provenientes de voluntários usuários e não usuários de esteróides anabólicos;
- Avaliação estatística dos dados clínicos laboratoriais obtidos de amostras de sangue cedidas pelos voluntários usuários e não usuários de esteróides anabólicos.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de massa Hewlett Packard (HP), modelo 5972, acoplado ao cromatógrafo a gás Hewlett Packard, modelo 6890, acoplado ao computador HP, modelo Vectra XM com *ChemStation* para integração e processamento dos cromatogramas e espectros de massa.
- Coluna Cromatográfica HP ultra 1 modificada (17m x 0,22 mm x 0,11 μ m)
- Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: nitrogênio, hidrogênio e hélio (Air Products)
- Balança analítica Sartorius Research – modelo R200D
- Agitador de tubos, modelo Tecnal
- Centrífuga Universal 16 A
- Bloco de aquecimento com sistema de evaporação, modelo Pierce

4.1.2 - Soluções-padrão

As soluções-padrão dos esteróides androgênicos da Tabela 4, foram obtidos da *Radian International* na concentração de 1mg/mL em metanol. A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho em metanol nas concentrações de 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL e para alguns esteróides de 0,1ng/mL. Para o padrão interno (metiltestosterona) foi preparada uma solução de 2ng/mL.

TABELA 4 – Esteróides anabólicos ou produtos de biotransformação avaliados neste estudo

Epitestosterona
Testosterona
Oximesterona
Noreticolanolona
Norandrosterona
3-hidroxi-estanozolol
16-beta-hidroxi-estanozolol
17-alfa-etil*
17-alfa-metil-5-beta**
9-alfa-F-18`
17-alfa-metil-5-alfa***
9-alfa-F-17``
Oxandrolona
Metenolona

Sendo: ` 9-alfa-fluoro-18-nor-17,17dimetilandrostan-4,13-dieno-11-beta-ol-3-ona;
 *** 17-alfa-metil-5-alfa-androstano-3-alfa-17-beta-diol; `` 9-alfa-fluoro-17-alfa-metilandrostan-4-eno-3-alfa-6-beta-11-beta-17-beta-tetrol; * 17-alfa-etil-beta-estrano-3-alfa-17-beta-diol; ** 17-alfa-metil-5-beta-androstano-3-alfa-17-beta-diol.

4.1.3 - Reagentes e soluções utilizados na extração

- Metanol p.a, Merck
- Éter terc-butilmetílico p.a, Merck
- Bicarbonato de sódio, Merck
- Carbonato de potássio, Merck
- ácido clorídrico, Merck
- MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoacetamida), Sigma
- Etanotiol, Aldrich Chemical Company
- Iodeto de amônio, Fluka
- Sulfato de sódio anidro, Química Moderna
- Acetato de sódio, Synth
- Enzima Beta-Glucuronidase E.Coli, 250.000 unidades, Sigma
- Tampão acetato de sódio pH 5,2
- Tampão fosfato pH 6,8
- Tampão sólido de $\text{NaHCO}_3:\text{K}_2\text{CO}_3$ (2:1)

4.1.4 - Amostras de urina

4.1.4.1 - Amostras de referência negativa

As amostras de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de esteróides anabólicos recrutados na Unidade de Reabilitação Cardíaca e Fisiologia do Exercício do Hospital do Coração (InCor) do Complexo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

4.1.4.2 - Amostras de referência positiva

As amostras de referência positiva foram obtidas pela adição de padrões de esteróides anabólicos em urina obtida de crianças com idades inferiores a 03 anos de vida.

4.1.4.3 - Amostras de usuários de esteróides anabólicos androgênicos

As amostras foram obtidas de voluntários que faziam uso de esteróides anabólicos recrutados na Unidade de Reabilitação Cardíaca e Fisiologia do Exercício do Hospital do Coração (InCor) do Complexo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

4.1.5 - Amostras de sangue

As amostras de sangue dos voluntários usuários e não usuários de esteróides anabolizantes foram coletadas na Unidade Ambulatorial do InCor e analisadas na Unidade de Análises Clínicas do Complexo HC/FMUSP.

4.1.6 - Seleção dos voluntários

A etapa clínica desse estudo foi desenvolvida em cooperação com a Unidade de Reabilitação Cardíaca e Fisiologia do Exercício do InCor – HC/FMUSP sob a coordenação da Dra Maria Janieire Nunes Alves. Nessa unidade foram recrutados os voluntários usuários e não usuários de esteróides anabólicos.

Foram incluídos nesse estudo 10 esportistas do sexo masculino, na faixa etária de 18 a 30 anos, que faziam uso regular de esteróides anabólicos a pelo menos 01 mês e que praticavam alguma modalidade esportiva (grupo teste). Também foram recrutados 10 esportistas que não faziam uso das substâncias

em questão e que praticavam regularmente atividades esportivas (grupo controle). Os voluntários possuíam idades entre 18 e 30 anos.

Esses 20 voluntários foram recrutados de acordo com critérios de inclusão e exclusão descritos no protocolo do estudo. Além disso, cada voluntário foi submetido a uma consulta médica que gerava uma ficha clínica (CRF) para o acompanhamento da equipe médica. Os voluntários do grupo teste também responderam a um questionário (anexo A) para que se conhecesse o padrão de uso dos esteróides anabólicos.

4.1.7 - Coleta das amostras

As coletas de urina e de amostras sanguíneas foram realizadas na unidade mencionada acima. Os exames laboratoriais foram realizados no Núcleo de Análises Clínicas do Complexo do Hospital das Clínicas – HC/FMUSP. As amostras urinárias foram acondicionadas em recipiente adequado e transportada em isopor, após congelamento a -20°C na Unidade de Biologia Molecular do InCor para o Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT), seguindo o padrão de cadeia de custódia. Foram coletadas para cada voluntário, no mínimo, 45 mL de urina. No LAT as amostras foram mantidas a -20°C e processadas, no máximo em 02 dias. As amostras sanguíneas foram coletadas na Unidade Ambulatorial do InCor e processadas no Núcleo de Análises Clínicas do HC. Foram coletadas amostras de 4 mL de sangue de cada voluntário ao final do ciclo de uso dos esteróides.

4.1.8 - Aspectos éticos

Antes da etapa de inclusão dos voluntários, esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do InCor – processo **SDC 2246/03/40** (anexo B). Além disso, no momento da entrevista inicial, o atleta era esclarecido sobre o Protocolo a ser desenvolvido pela equipe médica-farmacêutica e assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo C).

Assim, esse estudo seguiu as normas éticas preconizadas pelo Código de Nuremberg (1947), Declaração de Helsinki (1964) e revisões de 1975/1983/1989/1996 e 2000, ICH (“International Conference on Harmonisation”) e Resolução 196 (1996 - Ministério da Saúde- Brasil).

4.2 - MÉTODO

4.2.1 - Análise da amostra de urina

4.2.1.1 - Extração líquido-líquido dos esteróides anabólicos

Em um tubo de centrífuga foram colocados 4mL de urina, 2mL de tampão fosfato pH 6,8 e 40ul da enzima Beta-glucuronidase de *E.Coli*. Essa mistura foi submetida a uma temperatura de 55°C por 01 hora em estufa. Após esse período, a mistura foi retirada da estufa e resfriada a temperatura ambiente. Foi adicionado tampão sólido até o pH atingir valores entre 9,0 e 10,0 e em seguida 50 uL de metiltestosterona – 2ng/mL (P.I). Posteriormente, a amostra foi submetida a extração com 10 mL de éter terc-metilbútilico. O tubo foi agitado por 15 minutos e centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em um bécker contendo sulfato de sódio anidro e transferido para frascos previamente silanizados, os quais foram submetidos a fluxo de nitrogênio em bloco de aquecimento a 40°C (DELBEKE et al.,1995).

4.2.1.2 - Derivação com MSTFA/etanotiol/Iodeto de amônio

A derivação foi realizada com 40uL do agente de derivação por 02 horas a 80° C na barra de aquecimento.

4.2.1.3 - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

Do extrato final, 2uL foram injetados no GC/MS nas seguintes condições de operação:

Coluna: HP ultra 1 metilsilicone modificada / fluxo: 0,6 mL/min / gás carreador: hélio

Injetor: splitless / pressão de 9,2 psi / temperatura: 270° C

Forno:

Rampa de temperatura	Temperatura (°C)
inicial	120
70°C/min	182
4°C/min	235
30°C/min	300 (3min)

- Tempo total de corrida analítica: 19,31 minutos
- Método de ionização: impacto de elétrons (70eV)
- Modo de operação: SIM ("Single Ion Monitoring")

4.2.1.4 - Íons monitorados dos esteróides anabólicos

Os esteróides anabólicos da Tabela 04 foram analisados pela técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) através do modo de operação S.I.M. A Tabela 5 mostra, para cada esteróide anabólico, os íons monitorados. Além disso, são apresentados os tempos de retenção em relação ao P.I (TRR), em minutos, para cada esteróide.

TABELA 5 – Íons monitorados dos esteróides anabólicos derivados com MSTFA pelo modo S.I.M e respectivas abundâncias de acordo com Castilho (2001).

Esteróides anabólicos	m/z 01	m/z 02	m/z 03	TRR (min)
Epitestosterona	417 (10,8%)	432 (100%)	--	0,854
Testosterona	417 (14,3%)	432 (100%)	--	0,903
Oximesterona	389 (66,4%)	519 (5,9%)	534 (100%)	1,119
Noreticolanolona	315 (93,1%)	405 (100%)	420 (57,3%)	0,714
Norandrosterona	315 (51,6%)	405 (100%)	420 (47%)	0,659
3 hidroxí-estanozolol	254 (100%)	545 (9,3%)	560 (5,6%)	1,199
16 beta hidroxí estanozolol	218 (100%)	545 (0,35%)	560 (2,5%)	1,245
17 alfa etil	157 (100%)	331 (5,8%)	421 (2,8%)	0,939
17 alfa metil 5 beta	360 (22.3%)	435 (100%)	450 (16.1%)	0,849
9 alfa F 18	208 (100%)	357 (9,6%)	462 (32,1%)	0,847
17 alfa metil 5 alfa	360 (35.82%)	435 (100%)	450 (14.23%)	0,843
9 alfa F 17	462 (100%)	552 (69,9%)	642 (20%)	1,075
metenolona	195 (100%)	208 (23,8%)	446 (1,9%)	0,937
Oxandrolona	308 (32%)	321 (38%)	363 (100%)	1,029
Metiltestosterona(PI)*	301 (100%)	--	--	--

* **PI = Padrão Interno**

4.2.1.5 - Determinação da razão Testosterona/Epitestosterona (T/E):

A determinação da razão testosterona/epitestosterona (T/E) em amostra de urina foi realizada através da comparação das razões de área de cada esteróide endógeno ($m/z = 432$) com o padrão interno ($m/z = 301$). Também foi realizado o cálculo da razão T/E utilizando-se o valor de concentração de cada esteróide, quantificados por meio de uma curva de calibração.

4.2.2 - Parâmetros de validação analítica

Os parâmetros de validação analíticos foram avaliados a partir do “GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS” – Resolução 475, de 02 de março de 2002 (ANVISA/MS), bem como no “BIOANALYTICAL METHODS VALIDATION FOR HUMAN STUDIES” – Draft Guidance – CDER, 1998 (FDA/U.S.A) e artigos científicos, como os de Karnes et al. (1991), Braggio et al. (1996) e Bressole et al. (1996).

4.2.2.1 - Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado através da aplicação do método (extração e derivação) em diluições sucessivas com urina da amostra de referência positiva contendo os esteróides anabólicos da Tabela 04 e considerando tal valor como a menor concentração determinável com precisão aceitável, isto é, com coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Sua determinação foi realizada por meio de 06 replicatas, segundo o procedimento descrito no item 4.2.1.1. Considerou-se também, que o espectro de massa obtido deveria permitir adequada visualização do íon de menor intensidade monitorada, quando comparado com o espectro do padrão do esteróide anabólico na concentração de 100 ng/mL.

4.2.2.2 - Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método (extração e derivação) em diluições sucessivas com urina da amostra de referência positiva contendo os esteróides anabólicos, testosterona e epitestosterona e considerado como a menor concentração quantificável do íon $m/z = 432$, com precisão aceitável, isto é, com coeficiente de variação (CV) $\leq 10\%$ e exatidão acima de 90%. Sua determinação foi realizada por meio de 06 replicatas, segundo o procedimento descrito no item 4.2.1.1. Considerou-se também, que o espectro de massa obtido deveria permitir adequada visualização do íon de menor intensidade monitorada, quando comparado com o espectro do padrão do esteróide anabólico na concentração de 100 ng/mL.

4.2.2.3 - Linearidade

A correlação entre a resposta obtida do equipamento cromatográfico e a concentração nominal dos padrões, foi realizada a partir de 3 replicatas das concentrações de 10(LQ), 30, 50, 80, 100 e 200 ng/mL, sob as quais foram aplicados os métodos estatísticos de regressão linear ordinal e ponderadas ($1/x$ ou $1/x^2$). Considerou-se a existência de heteroscedasticidade (“Goodness-of-fit”) dos dados residuais (Neter et al.,1983; Sadray et al.,2003) , utilizando-se para isso o modelo de equação abaixo:

$$Y_{i,j} = a + bx + \epsilon_{i,j}$$

Onde: Y – razão de áreas (resposta do aparelho cromatográfico)

x – concentração em ng/mL

ϵ - resíduos

a – coeficiente angular

i – número de replicatas

b – coeficiente linear

j – concentração do calibrador

Valores de coeficiente de correlação maiores ou iguais a 0.99 foram considerados adequados.

4.2.2.4 - Precisão intra e inter ensaios

Para avaliar a precisão intra-ensaio foi realizada a análise, em um mesmo dia, de 06 replicatas de amostras de urina de criança adicionados de solução padrão dos esteróides anabólicos da Tabela 04 em concentrações iguais a 3 vezes o limite de detecção, e, de testosterona e epitestosterona em concentrações de 20 (CQB), 90 (CQM) e 150 ng/mL (CQA) , adicionadas de padrão interno, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.1.1.

A precisão inter-ensaio foi estabelecida da mesma forma que a precisão intra ensaio, porém realizada em 03 dias consecutivos.

Os coeficientes de variação (CV) para cada substância, nas diferentes concentrações, na determinação da precisão intra e inter ensaios, foram obtidos através do método estatístico da Análise de Variância (ANOVA) unifatorial (CAMPOS, S 2002), utilizando-se as equações da Tabela 6. Considerou-se adequados valores de CV inferiores a 15%.

TABELA 6 – Equações utilizadas nos cálculos da precisão intra e inter-ensaios na etapa de validação do método analítico.

ANOVA – Unifatorial
$\delta = n. \delta_i^2 + \delta_w^2$ Sendo: δ_i^2 – média da soma dos quadrados (inter grupos) δ_w^2 – média da soma dos quadrados (intra grupos)
$CV \text{ inter-ensaio} = \frac{(\delta_i^2)^{1/2}}{\text{média}}$
$CV \text{ intra-ensaio} = \frac{(\delta_w^2)^{1/2}}{\text{média}}$

4.2.2.5 - Inexatidão intra e inter ensaios

Para avaliar a concordância entre o valor determinado e o valor real foram analisadas as concentrações referentes aos controles de qualidade de testosterona e epitestosterona. (20, 90 e 150 ng/mL), em 03 replicatas, analisadas em um dia (intra-ensaio) e em 03 dias consecutivos (inter-ensaios). Considerou-se que o desvio não deveria ser superior a 15%.

4.2.2.6 - Recuperação

A recuperação relativa foi realizada com 03 replicatas de amostras de urina adicionadas das soluções padrão dos esteróides anabólicos em concentrações iguais a 3 vezes ao limite de detecção para os esteróides da Tabela 4. Para testosterona e epitestosterona foram utilizadas as concentrações referentes aos controles de qualidades (20, 90 e 150 ng/mL), conforme método descrito no item 4.2.1.1. Em paralelo, mais 03 replicatas foram analisadas, porém com a adição dos padrões, posteriormente a etapa de extração para cada concentração referida.

Os padrões internos, para ambos os casos, foram adicionados anteriormente a extração. A recuperação foi avaliada através da comparação

entre as razões de áreas das amostras em que os padrões foram adicionados anteriormente a extração, com aqueles adicionados posteriormente. Valores de recuperação acima de 50% foram considerados adequados.

4.2.2.7 - Estabilidade

O ensaio de estabilidade tem como finalidade garantir que a concentração da substância não sofre alterações após um período específico de armazenamento pré e/ou pós-processamento laboratorial (CHANG,2002). Neste estudo foi avaliada a estabilidade da amostra adicionada dos padrões e derivada, que permaneceu por um período de 12 horas à temperatura ambiente. Esse parâmetro analisado foi definido como estabilidade nas condições de análise. Também foi avaliada a estabilidade da amostra, adicionada dos padrões dos esteróides anabólicos, congelada a -20°C por 5 dias consecutivos. Após esse período as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e processadas de acordo com o item 4.2.1.1. Esse parâmetro analisado foi definido como estabilidade de curta duração. Amostras, adicionadas de padrões de esteróides, foram submetidas a 03 ciclos de congelamento e descongelamento, em 03 dias consecutivos, permitindo períodos de congelamento a -20°C por 12 horas e períodos de descongelamento à temperatura ambiente. Essas amostras, ao final do ciclo, também foram processadas de acordo com o item 4.2.1.1. Esse parâmetro foi definido com estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento.

Foram avaliadas para cada modalidade de estabilidade 05 amostras de concentração igual a 3 x LD para todos os esteróides anabólicos da Tabela 04. Os dados de razão de área da média das amostras submetidas ao ensaio de estabilidade foram comparadas com a média da razão de área de 03 amostras recém preparadas, de concentração igual a 3 x LD.

4.2.3 - Análise das amostras dos voluntários

4.2.3.1 - Análise das amostras de urina

As amostras de urina dos voluntários usuários e não usuários de esteróides anabólicos foram submetidas a análise, utilizando-se o método validado neste trabalho para a detecção e quantificação de esteróides pela técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

As amostras foram definidas como positivas para determinado esteróide anabólico, quando o tempo de retenção relativo (TRR) de um padrão recém preparado do esteróide apresentava-se similar ao TRR do anabólico na amostra dos voluntários. Além disso, o espectro de massa da substância na amostra do voluntário deveria apresentar similaridade com o espectro de massa do padrão. O espectro de massa era gerado utilizando-se o método SIM, o qual monitorava os íons apresentados na Tabela 05, para cada esteróide anabólico. Para os esteróides endógenos, testosterona e epitestosterona, a razão T/E deveria ser maior ou igual a 6. Para a determinação da relação T/E os esteróides eram quantificados, utilizando-se uma curva de calibração com valor de coeficiente de correlação acima de 0.99. O dado obtido da relação T/E, determinada através da quantificação, era comparada com a razão T/E determinada utilizando-se as razões de área entre o íon 432 e o íon 301 do padrão interno.

Além disso, as amostras foram submetidas ao processo de triagem para a verificação de uso de outras drogas ou fármacos de abuso, como maconha, cocaína, anfetamina e opiáceos. Para isso foi utilizado o método de enzimaímunoensaio, por meio do equipamento Syva ETS Plus® - Dade Behring e de padrões calibradores da Syva® Diagnostics products. As amostras foram consideradas positivas quando o resultado da análise semiquantitativa se apresentava superior ao valor de “cut-off” para cada substância avaliada.

4.2.3.2 - Análise das amostras de sangue

Os parâmetros laboratoriais avaliados nas amostras de sangue e as técnicas analíticas utilizadas foram:

- 1) Parâmetros Endócrinos – Hormônio Luteinizante – LH (Quimiluminescência), Hormônio Folículo Estimulante – FSH (Quimiluminescência) e Estradiol (Quimiluminescência)
- 2) Parâmetros Bioquímicos – Colesterol total (Colorimétrico enzimático), Lipoproteína de alta densidade - HDL-c (Colorimétrico) , Lipoproteína de baixa densidade - LDL-c* (Colorimétrico), Triglicérides – TG (Colorimétrico), Transaminases glutâmico pirúvica – TGP (Cinético em U.V) e oxaloacética – TGO (Cinético em U.V), Bilirrubina total, frações direta e indireta (Colorimétrico), creatinina (Colorimétrico - Jaffe) e albumina (Verde de bromocresol).

(*) A determinação do valor de LDL-colesterol foi realizada através fórmula de Friedewald.

Além disso, foi avaliado o risco cardíaco de cada voluntário usuário de esteróides anabólicos utilizando-se os índices de risco I e II de Castelli et al. (1983), respectivamente, razão colesterol total e HDL-c e razão LDL-c e HDL-c. Os riscos foram definidos da seguinte maneira:

- Baixo risco: razão colesterol total/HDL-c $\leq 5,1$ e razão LDL-c/HDL-c $\leq 3,3$;
- Alto risco: razão colesterol total/HDL-c $> 5,8$ e razão LDL-c/HDL-c $> 3,8$.

4.2.4 - Análise estatística dos dados laboratoriais

Os dados laboratoriais foram analisados utilizando-se a função estatística Teste-T considerando amostras independentes e presumindo variâncias iguais ou teste de Mann-Whitney, após aplicação do método de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade. Considerou-se a hipótese da diferença de médias igual a zero e nível de significância (alfa) igual a 0,05 para as duas caudas da distribuição. Utilizou-se na análise estatística o programa “InStat –GraphPad” (versão 3.0 – 2003).

5 - RESULTADOS

5.1 - Validação Analítica

5.1.1 - Linearidade

O método validado apresentou-se linear para a faixa de concentração estudada de 10 a 200 ng/mL ($r^2 > 0.99$) para os esteróides testosterona e epitestosterona, como mostra a Tabela 7.

TABELA 7 – Parâmetros de Linearidade de Testosterona e Epitestosterona

EPITESTOSTERONA	
Parâmetro	Valor
Coeficiente angular	0,021763
Coeficiente linear	-0,04669
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99963

TESTOSTERONA	
Parâmetro	Valor
Coeficiente angular	0,034173
Coeficiente linear	-0,06596
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99948

A aplicação do método da regressão linear ordinal e ponderadas ($1/x$ e $1/x^2$) permitiram desvios menores que 15% para cada calibrador, quando comparados com os valores de concentração nominal. Entretanto, a regressão linear ponderada ($1/x^2$) foi considerada mais adequada, visto que permitiu dados com menores efeitos residuais, como mostram as Tabelas 8 e 9 para Testosterona e Epitestosterona.

TABELA 8 – Exatidão dos dados recalculados em função de cada modelo de regressão (“Goodness-of-fit”) para testosterona.

% do valor Nominal				
Conc Nominal (ng/mL)	Razão de área	Regressão Ordinal	Regressão Ponderada ($1/x$)	Regressão Ponderada ($1/x^2$)
10	0,271	70,75	92,93	98,6
30	1,0275	101,6	106,6	106,65
50	1,512	90,93	93	92,35
80	2,891	110,16	109,8	108,16
100	3,332	101,77	101	99,43
200	6,412	98,53	96,7	94,78

TABELA 9 – Exatidão dos dados recalculados em função de cada modelo de regressão (“Goodness-of-fit”) para epitestosterona.

% do valor Nominal				
Conc Nominal (ng/mL)	Razão de área	Regressão Ordinal	Regressão Ponderada ($1/x$)	Regressão Ponderada ($1/x^2$)
10	0,174	90,8	102	101,4
30	0,578	93	95,72	95,7
50	0,975	92,76	93,8	93,9
80	1,871	110,14	109,94	110,15
100	2,148	101	100,64	100,84
200	4,22	98,75	97,8	98

5.1.2 - Limite de Detecção

Os limites de detecção (LD) para cada esteróide anabólico ou produtos de biotransformação avaliados pela técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas apresentam-se na Tabela 10.

TABELA 10 – Limites de detecção dos esteróides anabólicos avaliados

Esteróide Anabólico	LD (ng/mL)
Epitestosterona	1.0
Testosterona	1.0
Oximesterona	0.5
Noreticolanolona	2.0
Norandrosterona	1.5
3 hidroxí-estanozolol	15.0
16 beta hidroxí estanozolol	15.0
17 alfa etil	5.0
17 alfa metil 5 beta	10.0
9 alfa F 18	5.0
17 alfa metil 5 alfa	5.0
9 alfa F 17	10.0
metenolona	5.0
Oxandrolona	2.0

5.1.3 - Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação para ambos os esteróides testosterona e epitestosterona, estudados pela técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, foram de 10 ng/mL e apresentaram valores de precisão e exatidão muito semelhantes, o que permitiu que os dados fossem expressos em uma única tabela

TABELA 11 – Limite de quantificação dos esteróides testosterona e epitestosterona

LQ	Precisão	Exatidão
10 ng/mL	5.6%	90%

5.1.4 - Precisão intra e inter-ensaios

A Tabela 12 apresenta os valores de coeficiente de correlação (CV) para os ensaios de precisão intra e inter-ensaio cada esteróide anabólico analisado na etapa qualitativa. O CV para os ensaios intra e inter-ensaios apresentaram-se menores que 15%.

TABELA 12 – Resultados do ensaio de precisão intra-ensaio para cada esteróide anabólico.

SUBSTÂNCIA	Precisão intra-ensaio(%)	Precisão inter-ensaio (%)
Oximesterona	9.14	3.84
Noreticolanolona	4.99	2.07
Norandrosterona	10.02	3.91
3 hidroxí-estanozolol	9.09	4.05
16 beta hidroxí estanozolol	7.58	2.41
17 alfa etil	6.69	2.98
17 alfa metil 5 beta	10.16	3.37
9 alfa F 18	3.03	1.33
17 alfa metil 5 alfa	10.52	4.70
9 alfa F 17	7.2	3.21
Metenolona	8.21	10.45
Oxandrolona	8.63	4.93

As Tabelas 13 e 14 apresentam os dados de precisão intra e inter-ensaios para os controles de qualidade (CQ) dos esteróides testosterona e epitestosterona (etapa quantitativa). O CV para os ensaios intra e inter-ensaios apresentaram-se menores que 15%.

TABELA 13 – Precisão intra-ensaio para os CQ de testosterona

Testosterona	Precisão intra-ensaio (%)	Precisão inter-ensaio (%)
CQA (150ng/mL)	1.67	1.52
CQM (90ng/mL)	6.66	1.02
CQB (20ng/mL)	2.28	1.98

TABELA 14 – Precisão intra-ensaio para os CQ de epitestosterona

Epitestosterona	Precisão intra-ensaio (%)	Precisão inter-ensaio (%)
CQA (150ng/mL)	1.49	5.08
CQM (90ng/mL)	6.47	5.35
CQB (20ng/mL)	5.39	3.20

5.1.5 - Inexatidão intra e inter-ensaios

As Tabelas 15 e 16 apresentam os dados de inexatidão intra e inter-ensaios para os controles de qualidade (CQ) dos esteróides testosterona e epitestosterona (etapa quantitativa). O desvio para cada concentração analisada não apresentou variação maior que 15%, quando comparados com o valor nominal.

TABELA 15 – Inexatidão intra e inter-ensaios para os CQ de testosterona

Testosterona	Inexatidão intra-ensaio (%)	Inexatidão inter-ensaio (%)
CQA (150ng/mL)	-0.6	-0.82
CQM (90ng/mL)	-4.43	-6.29
CQB (20ng/mL)	-11.6	-13.0

TABELA 16 – Inexatidão intra e inter-ensaios para os CQ de epitestosterona

Epitestosterona	Inexatidão intra-ensaio (%)	Inexatidão inter-ensaio (%)
CQA (150ng/mL)	-3.5	-6.9
CQM (90ng/mL)	-8.1	-9.15
CQB (20ng/mL)	8.4	11.57

5.1.6 - Recuperação

A Tabela 17 apresenta os dados do ensaio de recuperação para os esteróides anabólicos da etapa qualitativa e as Tabelas 18 e 19 os da etapa quantitativa. A maioria dos esteróides analisada apresentou recuperação superior a 80%, porém as substâncias 16-beta-hidroxi-estanozolol e 9-alfa-flúor-17 apresentaram, respectivamente, recuperações de 26% e 41.7%.

TABELA 17 – Recuperação dos esteróides anabólicos

Esteróide anabólico	Recuperação (%)
Oximesterona	93.0
Noreticolanolona	96.0
Norandrosterona	91.0
3 hidroxi-estanozolol	96.0
16 beta hidroxi estanozolol	26.0
17 alfa etil	94.0
17 alfa metil 5 beta	84.0
9 alfa F 18	82.5
17 alfa metil 5 alfa	104.0
9 alfa F 17	41.7
Metenolona	101.6
Oxandrolona	93.0

TABELA 18 – Recuperação de epitestosterona

EPITESTOSTERONA	Recuperação (%)
CQA (150ng/mL)	92.94
CQM (90ng/mL)	75.6
CQB (20ng/mL)	81.81
	Recuperação média (%)
	83.45

TABELA 19 – Recuperação de testosterona

TESTOSTERONA	Recuperação (%)
CQA (150ng/mL)	90.82
CQM (90ng/mL)	70.6
CQB (20ng/mL)	81.35
	Recuperação média (%)
	80.92

5.1.7 - Estabilidade

A Tabela 20 mostra os dados de estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento dos esteróides anabólicos da etapa qualitativa e quantitativa, bem como os de estabilidade de curta duração (05 dias) e nas condições de análise (12 horas à temperatura ambiente). A variação em relação a amostra fresca é dada em porcentagem. Tal variação não excedeu 15% quando comparada com o valor da amostra fresca.

TABELA 20 – Estabilidade dos esteróides anabólicos analisados neste estudo.

Substância	03 Ciclos de congelamento/ descongelamento Variação (%)	Estabilidade de curta duração (05 dias a -20°C) Variação (%)	Estabilidade nas condições de análise (12 hs a temp ambiente) Variação (%)
Epitestosterona	-4.39	4.05	< 1
Testosterona	4.34	3.29	< 1
Oximesterona	-9.83	-10.17	1.5
Noreticolanolona	-6.15	1.23	2.2
Norandrosterona	-14.4	13.4	< 1
3 hidroxí- estanozolol	-6.28	-11.21	< 1
16 beta hidroxí estanozolol	-10.12	-8.86	3.85
17 alfa etil	-8.45	-9.45	< 1
17 alfa metil 5 beta	-10.34	12.07	2.5
9 alfa F 18	0.95	-1.77	6.7
17 alfa metil 5 alfa	6.79	-14.08	5
9 alfa F 17	-7.08	13	10
Metenolona	-6.32	-8.66	< 1
Oxandrolona	-8.6	-12.4	1.76

5.2 - Etapa Clínica

5.2.1 - Exames laboratoriais

As Tabelas 21, 22 e 23 mostram os resultados dos dados laboratoriais dos voluntários não usuários (grupo teste) e usuários de esteróides anabólicos (grupo controle), além de análise estatística e valores de referência.

TABELA 21 – Resultados laboratoriais dos parâmetros hormonais para os grupos controles e teste

GRUPO CONTROLE	IDENTIFICAÇÃO	LH	FSH	ESTRADIOL
1	R.L.S	2.6	3.3	52.4
2	J.R.S	2.1	4.4	36.8
3	M.L	3.2	4.6	44.8
4	R.A.P	3.4	4.1	50.3
5	C.P.A	2.3	3.9	32.9
6	A.M.S	2.1	3.1	32.6
7	W.L.G.C	3.3	3.6	41.6
8	E.B.O	2.6	4.2	35.8
9	C.R.P	2.2	4.4	32.6
10	N.M	3.1	3.2	55.9
MÉDIA		2.69	3.88	41.57
D.P.M		0.51	0.55	8.83
GRUPO TESTE				
1	R.T.T.A	0.1	0.1	50.6
2	T.C.C	1.8	2.7	30.1
3	P.F.C	0.4	1.4	20.1
4	J.C.M.M	0.8	0.4	52.4
5	O.G	0.3	0.2	58.2
6	R.G.V	0.1	0.5	106.6
7	A.R	0.5	0.2	52.4
8	F.G.F	0.2	0.5	48.6
9	C.A.M.D	0.1	0.6	98.6
10	A.P.G	0.2	0.1	80.8
MÉDIA		0.45	0.67	59.84
D.P.M		0.52	0.80	27.72
SIGNIFICÂNCIA		p < 0.001*	p < 0.001*	NS**
VALORES DE REFERÊNCIA		0.8-7.6 mUI/mL	0.7-11.1 mUI/mL	56 pg/mL

Sendo: LH – Hormônio Luteinizante; FSH – Hormônio Folículo Estimulante; (*) pelo teste t não pareado;

(**) pelo teste de Mann-Whitney

TABELA 22 – Resultados laboratoriais dos perfis lipídicos para os grupos controles e teste

GRUPO CONTROLE	IDENTIFICAÇÃO	HDL	LDL	COLESTEROL total	TRIGLICÉRIDES
1	R.L.S	39	118	169	62
2	J.R.S	40	129	192	117
3	M.L	45	126	187	78
4	R.A.P	42	143	201	82
5	C.P.A	52	123	184	47
6	A.M.S	40	147	196	44
7	W.L.G.C	62	87	178	145
8	E.B.O	49	88	165	138
9	C.R.P	33	88	135	69
10	N.M	44	127	199	142
MÉDIA		44.6	117.6	180.6	92.4
D.P.M		8.11	22.4	20.1	39.58
GRUPO TESTE					
1	R.T.T.A	12	201	243	107
2	T.C.C	23	174	214	85
3	P.F.C	4	182	208	112
4	J.C.M.M	14	170	174	53
5	O.G	8	197	228	92
6	R.G.V	14	186	143	66
7	A.R	10	200	182	60
8	F.G.F	19	163	194	58
9	C.A.M.D	8	173	200	94
10	A.P.G	26	136	175	63
MÉDIA		13.8	178.2	196.1	79
D.P.M		7	19.85	29.1	21.61
SIGNIFICÂNCIA		p < 0.001*	p < 0.001*	NS	NS
VALORES DE REFERÊNCIA		< 40 (baixo)	< 100 (ótimo)	< 200 (ótimo)	< 150 (ótimo)
(mg/dL)		> 60 (alto)	100 a 129 (desejável)	200 a 239 (limítrofe)	150 a 200 (limítrofe)
			130 a 159 (limítrofe)	≥ 240 (alto)	200 a 499 (alto)
			160 a 189 (alto)		≥ 500 (muito alto)
			≥ 190 (muito alto)		

Sendo: HDL – Lipoproteína de alta densidade; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; (*) pelo teste t não pareado.

TABELA 23 – Resultados laboratoriais dos parâmetros de avaliação hepática e renal para os grupos controles e teste

GRUPO CONTROLE	IDENTIFICAÇÃO	TGO	TGP	BILIRRUBINA total	CREATININA	ALBUMINA
1	R.L.S	25.52	33.53	0.44	1.3	4.6
2	J.R.S	34.13	31.96	0.75	0.85	4.6
3	M.L	18.18	19.58	0.47	0.93	4.3
4	R.A.P	19.26	29.33	0.48	0.9	4.18
5	C.P.A	10.89	13.56	0.57	0.66	4.66
6	A.M.S	25.8	22.6	0.54	0.98	4.2
7	W.L.G.C	24.6	19.8	0.43	1.2	4.66
8	E.B.O	27	17.6	0.51	1.05	4.12
9	C.R.P	26.4	21.22	0.85	0.98	4.52
10	N.M	27.1	19.3	0.41	1.2	4.11
MÉDIA		23.9	22.85	0.545	1.005	4.395
D.P.M		6.33	6.57	0.14	0.19	0.23
GRUPO TESTE						
1	R.T.T.A	22.1	16.3	0.31	1.2	4.1
2	T.C.C	25.2	18.2	0.57	1.22	4.61
3	P.F.C	17.1	22.1	0.76	1.4	4.39
4	J.C.M.M	16.12	11.8	0.62	0.78	4.21
5	O.G	26.67	11.33	0.55	0.89	4.12
6	R.G.V	23	22.1	0.6	0.9	4.31
7	A.R	26.2	19.2	0.73	1.2	4.28
8	F.G.F	19.8	14.1	0.51	0.86	4.62
9	C.A.M.D	28.4	16	0.56	1.09	4.34
10	A.P.G	33.2	30.2	0.44	1.4	4.16
MÉDIA		23.78	18.13	0.565	1.09	4.314
D.P.M		5.26	5.65	0.13	0.22	0.18
SIGNIFICÂNCIA		NS*	NS*	NS*	NS*	NS*
VALORES DE REFERÊNCIA		até 18 U/L	até 22 U/L	até 1 mg/dL	0.6 – 1.4 mg/dL	3.3 – 5.2 g/dL

Sendo: TGO/AST – Aspartato aminotransferase; TGP/ALT – Alanina aminotransferase; (*) pelo teste t não pareado;

Os dados matemáticos utilizados na confecção dos gráficos dos parâmetros laboratoriais foram a média (M) e o erro padrão da média (EPM) de cada grupo. Com a finalidade de padronizar a disposição dos resultados nos gráficos A e B, chamaremos de **Controle (C)** os resultados dos voluntários não usuários e de **Teste (T)** os dos voluntários usuários de esteróides.

5.2.1.1 - Parâmetros endócrinos

Os níveis de LH e FSH dos usuários de esteróides apresentaram diferenças significativas ($p < 0.001^*$) quando comparados com os dos controles. Assim, os atletas que não faziam uso de esteróides apresentaram níveis de LH e FSH dentro da normalidade. Os níveis de estradiol do grupo teste não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparado com o grupo controle ($p > 0.05$).

FIGURA 12 – Comparação entre os dados de LH e FSH dos voluntários usuários (teste) e não usuários de esteróides anabólicos (controles).

5.2.1.2 - Parâmetros bioquímicos

Os níveis de HDL-c e LDL-c dos usuários de esteróides apresentaram diferenças significativas ($p < 0.001^*$) quando comparados com os dos controles. Assim, os atletas que não faziam uso de esteróides apresentaram níveis de HDL e LDL dentro da normalidade. Os níveis dos demais parâmetros monitorados apresentaram-se dentro dos limites de referência para ambos os grupos ($p > 0.05$).

FIGURA 13 – Comparação entre os dados de HDL e LDL dos voluntários usuários (teste) e não usuários de esteróides anabólicos (controles)

A avaliação dos riscos I e II de Castelli (1987) para cada usuário de esteróide anabólico avaliado está apresentada na Tabela 24.

TABELA 24 – Parâmetros de riscos I e II de Castelli (1987) dos usuários de esteróides anabólicos.

No	Iniciais	Risco I	Risco II	Resultado
1	R.T.T.A	20,25	16,75	Alto risco
2	T.C.C	9,3	7,56	Alto risco
3	P.F.C	52	45,5	Alto risco
4	J.C.M.M	12,4	12,14	Alto risco
5	O.G	28,5	24,6	Alto risco
6	R.G.V	10,21	13,3	Alto risco
7	A.R	18,2	20	Alto risco
8	F.G.F	10,21	8,58	Alto risco
9	C.A.M.D	25	21,62	Alto risco
10	A.P.G	6,73	5,23	Alto risco

5.2.1.3 - Triagem para drogas e/ou fármacos de abuso

A triagem para drogas e fármacos de abuso foi realizada pelo equipamento Syva ETS Plus®. A Tabela 25 apresenta os resultados para os voluntários usuários de esteróides anabólicos.

TABELA 25 – Resultados da análise semiquantitativa para fármacos/drogas de abuso dos voluntários usuários de esteróides anabólicos.

No	Iniciais	Maconha	Cocaína	Anfetamina	Opiáceos
1	R.T.T.A	Positivo	negativo	negativo	negativo
2	T.C.C	Positivo	negativo	negativo	negativo
3	P.F.C	negativo	negativo	negativo	negativo
4	J.C.M.M	negativo	negativo	negativo	negativo
5	O.G	negativo	negativo	negativo	negativo
6	R.G.V	negativo	negativo	negativo	negativo
7	A.R	negativo	negativo	negativo	negativo
8	F.G.F	negativo	negativo	negativo	negativo
9	C.A.M.D	negativo	negativo	negativo	negativo
10	A.P.G	Positivo	negativo	negativo	negativo

5.3 - Resultados das Entrevistas (Questionário)

Os dados obtidos, através da aplicação do questionário (anexo A), durante a fase de inclusão dos voluntários usuários de esteróides anabólicos no estudo, estão dispostos na Tabela 26.

TABELA 26 – Principais dados obtidos por meio do questionário (anexo A) na fase de inclusão dos voluntários usuários de esteróides

Numeração	Identificação do voluntário**	Esteróide(s) utilizado(s)*	Meio de obtenção	Padrão de uso	Período do ciclo	No de ciclos realizados em 2003	Substâncias utilizadas ao final do ciclo	Efeitos adversos observados	Modalidade esportiva
1	R.T.T.A	Winstrol®	Farmácias e Lojas de suplementos alimentares	1x ao dia	30 dias	01	Novaldex® Clomid®	n.r	Musculação
2	T.C.C	Winstrol®	Academias	Todos os dias em semanas alternadas	30 dias	02	Megalon 140	Queda da competência imunológica/acne	Jiu-jitsu
3	P.F.C	Winstrol®	Lojas de suplemento alimentar	2 x por semana	30 dias	01	Prófase 5000®	Hipertensão arterial/ acne	Musculação
4	J.C.M.M	Winstrol®	Academias	2 x por semana	30 dias	02	n.r	n.r	Jiu-jitsu
5	O.G	Durateston®	Farmácias	Pirâmide	40 dias	01	Clomid®	n.r	Musculação

Sendo – n.r - dado não relatado pelo voluntário; * - todos os esteróides foram utilizados por via intramuscular (I.M); ** voluntários com idades entre 18 e 30 anos; Winstrol® - estanozolol; Durateston® - ésteres de testosterona

TABELA 26 (continuação) – Principais dados obtidos por meio do questionário (anexo A) na fase de inclusão dos voluntários usuários de esteróides

Numeração	Identificação do voluntário**	Esteróide(s) utilizado(s)*	Meio de obtenção	Padrão de uso	Período do ciclo	No de ciclos realizados em 2003	Substâncias utilizadas ao final do ciclo	Efeitos adversos observados	Modalidade esportiva
6	R.G.V	Durateston® Primobolan®	Farmácias	Pirâmide	42 dias	03	Prófase 5000®	Nódulo na mama direita/ginecomastia	Musculação
7	A.R	Winstrol®	Com amigos	Dias alternados	30 dias	01	n.r	n.r	Musculação e Jiu-Jitsu
8	F.G.F	Winstrol®	Lojas de suplementos alimentares	Pirâmide	49 dias	01	n.r	acne	Musculação e Jiu-Jitsu
9	C.A.M.D	Winstrol®	Lojas de suplementos alimentares	Pirâmide	49 dias	02	n.r	ansiedade	Musculação
10	A.P.G	Durateston® Winstrol®	Com amigos	Pirâmide	42 dias	02	Novaldex®	n.r	Musculação e Jiu-Jitsu

Sendo – n.r - dado não relatado pelo voluntário; * - todos os esteróides foram utilizados por via intramuscular (I.M); ** voluntários com idades entre 18 e 30 anos; Winstrol® - estanozolol; Durateston® - ésteres de testosterona; Primobolan® - metenolona

Além disso, as Figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, a alta incidência de uso do esteróide estanozolol (Winstrol®) e a incidência de uso de substâncias ilícitas associadas aos esteróides anabólicos. A Figura 14 evidencia que a maioria dos voluntários usuários de esteróides fazia uso de estanozolol (70%) e os demais de testosterona e metenolona (30%). A Figura 15 demonstra que apenas 3 (30%) dos usuários de esteróides estudados faziam uso de canabinóides. Os demais (70%) apresentaram resultado negativo na triagem para drogas/fármacos de abuso.

TESTOSTERONA E METENOLONA

FIGURA 14 – Incidência de uso de esteróides anabólicos pelos voluntários estudados.

FIGURA 15 – Incidência de uso de fármacos/drogas de abuso pelos voluntários estudados.

A Figura 16 mostra que os esteróides anabólicos consumidos pela maioria dos voluntários incluídos neste estudo foram obtidos em lojas de suplementos alimentares ou com amigos.

FIGURA 16 – Locais de obtenção dos esteróides anabólicos pelos voluntários estudados .

A Figura 17 demonstra que os padrões de uso observados nos voluntários incluídos neste estudo foram, o de pirâmide e o irregular. O padrão irregular caracteriza-se por seqüências de uso determinadas aleatoriamente e não classificadas pela literatura.

FIGURA 17 – Padrões de uso observados nos voluntários incluídos neste estudo.

5.4 - Resultados Analíticos

A análise, por GC-MS, das amostras de urina dos 10 voluntários usuários de esteróides, permitiu a detecção e/ou a quantificação de substâncias anabolizantes em todas as amostras. Os cromatogramas e os respectivos espectros de massa de cada esteróide anabólico detectado estão dispostos nas Figuras de 20 a 54. Além disso, a Figura 32 mostra a alteração na abundância dos esteróides endógenos, androsterona e eticolanolona, em voluntários usuários crônicos de estanozolol. As Figuras 18 e 19 mostram o padrão urinário dos voluntários não usuários de esteróides anabólicos.

FIGURA 18 – Cromatograma de amostra de voluntário não usuário de esteróides anabólicos.

(Não se observam a presença de esteróides exógenos. As flechas indicam a presença dos esteróides endógenos, androsterona e eticolanolona -Abundância > 220.000.)

FIGURA 19 – Cromatograma de amostra de voluntário não usuário de esteróides anabólicos.

(As flechas indicam os esteróides endógenos epitestosterona e testosterona. A razão T/E apresenta valor de aproximadamente 1.)

FIGURA 20 – Cromatograma da amostra do voluntário 01 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol -Winstrol[®])

FIGURA 21 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-

FIGURA 22 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 23 – Cromatograma da amostra do voluntário 02 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol -Winstrol®)

FIGURA 24 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 25 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 26 – Cromatograma da amostra do voluntário 03 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol -Winstrol®)

FIGURA 27 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 28 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 29 – Cromatograma da amostra do voluntário 04 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol -Winstrol®)

FIGURA 30 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 31 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 32 – Cromatograma padrão das amostras do voluntários de 01 a 04 e de 07 a 10 analisadas por GC/MS (SIM).

(As flechas indicam a presença dos esteróides endógenos, androsterona e etiocolanolona (em baixa abundância) devido ao uso de crônico do esteróide estanozolol - abundância < 100.000).

FIGURA 33 – Cromatograma da amostra do voluntário 05 analisada por GC/MS (SIM).

(As flechas indicam a presença dos esteróides endógenos epitestosterona e testosterona. A razão T/E = 16,9.)

FIGURA 34 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona

FIGURA 35 – Espectro de massas do esteróide endógeno testosterona.

FIGURA 36 – Cromatograma da amostra do voluntário 06 analisada por GC/MS (S.I.M).
(As flechas indicam a presença dos esteróides endógenos epitestosterona e testosterona. A razão T/E = 16.4)

FIGURA 37 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona

FIGURA 38 – Espectro de massas do esteróide endógeno testosterona

FIGURA 39 – Cromatograma da amostra do voluntário 06 analisada por GC/MS (S.I.M).
(A flecha indica a presença do esteróide anabólico metenolona - Primobolam[®])

FIGURA 40 – Espectro de massas do esteróide metenolona.

FIGURA 41 – Cromatograma da amostra do voluntário 07 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol - Winstrol®)

FIGURA 42 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 43 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 44 – Cromatograma da amostra do voluntário 08 analisada por GC/MS (SIM).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol - Winstrol®)

FIGURA 45 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 46 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 47 – Cromatograma da amostra do voluntário 09 analisada por GC/MS (S.I.M).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol -Winstrol®)

FIGURA 48 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

FIGURA 49 – Espectro de massas do produto de biotransformação 16 beta hidroxi- estanozolol

FIGURA 50 – Cromatograma da amostra do voluntário 10 analisada por GC/MS (S.I.M).
(As flechas indicam a presença dos esteróides endógenos epitestosterona e testosterona. A razão T/E = 8.8)

FIGURA 51 – Espectro de massas do esteróide endógeno epitestosterona

FIGURA 52 – Espectro de massas do esteróide endógeno testosterona

FIGURA 53 – Cromatograma da amostra do voluntário 10 analisada por GC/MS (S.I.M).
(As flechas indicam a presença dos produtos de biotransformação do esteróide anabólico estanozolol - Winstrol®)

FIGURA 54 – Espectro de massas do produto de biotransformação 3 hidroxi-estanozolol

6. DISCUSSÃO

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas apresenta-se na atualidade como a técnica de escolha para a detecção de esteróides anabólicos no controle da dopagem no esporte (GEORGAKOPOULOS et al., 1999). Assim, a partir da padronização por Castilho (2001) do método em GC-MS desenvolvido por Delbeke et al. (1995), essa dissertação propôs a validação de tal técnica analítica com finalidades qualitativas e quantitativas para a confirmação do uso de tais substâncias pelos voluntários avaliados nesse estudo e para o Programa de Controle de Dopagem no Esporte do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT-USP).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos no Brasil (MOREAU; SILVA, 2001; CONCEIÇÃO et al., 1999), como também a toxicocinética dos esteróides anabólicos, foram considerados na definição das substâncias avaliadas nesse trabalho (Tabela 4).

O método analítico validado empregou coluna de metilsilicone, como a HP-1 (17m x 0.22 mm x 0.11 mm) acoplada ao GC, porque tal coluna permite adequada resolução e estabilidade a temperaturas de 300°C, visto que o equipamento cromatográfico foi operado em elevadas temperaturas. Além disso, a espessura do filme de 0.11 mm da coluna utilizada, permitiu menor adsorção da amostra à fase estacionária e consequentemente um tempo de análise menor quando comparados com métodos utilizados na análise de compostos com características lipídicas (KITSON et al., 1996).

O injetor foi operado no modo “splitless”, pois as amostras utilizadas apresentavam baixas concentrações do analito (ng/mL), como também a temperatura de 270⁰ C devido ao alto ponto de ebulição dos esteróides analisados (ex: testosterona - p.e = 155°C).

A programação de temperatura do forno do cromatógrafo a gás apresentou temperatura inicial de 120°C e programação de velocidade de aquecimento de 4°C/minuto, após 182°C, para permitir melhor separação dos componentes da amostra. A temperatura final de 300⁰ C foi utilizada para garantir a total eluição dos compostos anabólicos da coluna (GERHARDS et al., 1999).

O espectrômetro de massas (MS) foi operado no modo S.I.M (single íon monitoring). O modo S.I.M possibilita o monitoramento de íons de maior abundância pré-estabelecidos pelo modo SCAN, permitindo uma adequada sensibilidade e especificidade para o método por meio de um aumento da relação sinal/ruído (KITSON et al., 1996), e conseqüentemente, menores limites de detecção e quantificação (MULLER et al., 1999). Trabalhos da literatura utilizam o modo de detecção S.I.M com ionização por impacto de elétrons (I.E) para a detecção de esteróides anabólicos em urina, como é o caso dos de Chung et al. (1990) e Yoon e Lee (2001). Informações sobre os espectros de massas de substâncias, como os esteróides anabólicos, apresentam-se compilados em guias, como o "Mass Spectral and GC data" (1992), visto que a ionização por I.E é a mais utilizada quando a espectrometria é associada ao GC. Assim, apesar de alguns autores como Kitson et al. (1996) sugerirem que a ionização química permitiria a formação de fragmentos de maiores abundâncias relativas e maior sensibilidade e especificidade na análise de esteróides anabólicos androgênicos por GC/MS, tal técnica não é amplamente utilizada.

Na etapa de preparação das amostras, tanto os vials utilizados quanto o "liner" do injetor do GC apresentavam-se silanizados, devido a grupamentos químicos na estrutura molecular dos esteróides capazes de reagirem com o grupos silanos do vidro (MULLER et al., 1999). A ocorrência dessas reações determinaria a perda de moléculas das amostras analisadas, e possíveis resultados falso-negativos.

Como a amostra biológica era previamente submetida à hidrólise enzimática para a liberação dos grupos glicuronídeos, foi utilizado o modo de extração líquido-líquido. O solvente orgânico empregado para tal extração foi o éter terc-metil butílico, por permitir uma extração tão eficiente quanto a do éter dietílico, além de apresentar menor volatilidade e não formar peróxidos em solução (SCHÄNZER, 1996).

A extração ocorreu em pH 9-10, pois valores de pH superiores a esses, não permitiriam adequada recuperação para oxandrolona e 3-hidroxi-estanozolol (SCHÄNZER, 1996).

Ainda na etapa de extração, foi utilizado a enzima *Beta-glucuronidase* de *E. coli* para a hidrólise do ácido glicurônico conjugado aos esteróides, visto que Castilho (2001) demonstrou maior efetividade de tal enzima em relação a de *H. pomatia*. Masse et al. (1989), também demonstraram que *H. pomatia* determina a conversão de certos esteróides anabólicos, como os androstano-5-ene-3-beta,17-beta-diol a testosterona. Os trabalhos de Ayotte et al. (1996) e Haber et al. (2001) também utilizam a enzima de *E. coli* para tal finalidade.

A derivação foi realizada com MSTFA/NH₄I/etanotiol, pois de acordo com Segura et al. (1998) e Kitson et al. (1996) essa solução é a mais utilizada no caso dos esteróides anabólicos, os quais possuem grupamentos hidroxil e ceto-ácidos, responsáveis pela baixa volatilidade e instabilidade térmica dessas substâncias. Além disso, a derivação com MSTFA, associado a ionização por impacto de elétrons, permite a formação de íons específicos com maior abundância (*m/z*), como também, o aumento da relação sinal/ruído (GERHARDS et al., 1999).

Do ponto de vista da qualidade, o uso de padrão-interno é essencial na análise de substâncias por GC/MS, já que tal substância deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes a das substâncias analisadas e desta forma não interferir na eluição dos analitos (GERHARDS et al., 1999). Assim, a metiltestosterona foi utilizada como padrão-interno na validação desse método analítico. Além disso, a metiltestosterona, por ser extensamente metabolizada pelo sistema porta-hepático não é excretada inalterada na urina. Os trabalhos de Delbeke et al. (1995) e Haber et al. (2001), entre outros, optam por essa mesma substância como padrão-interno.

Na preparação dos padrões para o ensaio de validação, foi utilizado como matriz biológica urina de crianças com idade inferior a 3 anos, visto que nesta fase do desenvolvimento são encontrados níveis insignificantes de testosterona e epitestosterona na urina (Wilson, 1996). O estudo de Ayotte et al. (1996) também utilizou urina de crianças para o preparo de padrões e controles de qualidade.

A validação do método foi fundamentada nos guias e artigos apresentados no item 4.2.2. Deste modo, o parâmetro linearidade foi obtido na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL para os esteróides endógenos,

testosterona e epitestosterona, os quais devem ser quantificados e avaliados de por meio da razão T/E de acordo com o C.O.I (2003) em programas de controle de dopagem. A concentração de 200 ng/mL foi definida como limite de quantificação superior já que concentrações urinárias superiores são consideradas dopagem para epitestosterona (C.O.I,2003).

A regressão ordinal foi utilizada para a obtenção dos valores dos coeficientes angulares, lineares e de determinação para cada um dos esteróides endógenos. O valor do r^2 foi acima de 0.99, indicando adequada correlação linear (BRAGGIO et al., 1996). Entretanto, como a faixa de concentração dos calibradores apresentou alta magnitude, os modelos de regressão ponderada foram avaliados, mostrando menores efeitos residuais quando comparados com o modelo ordinal. A regressão ponderada deve ser empregada quando o erro residual (δ^2) não é constante em todas as observações. Esse fato é denominado, em estatística, heteroscedasticidade (NETER et al.,1983; SADRAY et al.,2003).

A heteroscedasticidade surge quando uma larga faixa de calibradores é utilizada na determinação da linearidade de um método. Assim, quando o modelo de regressão ordinal é aplicado, os parâmetros de linearidade são definidos em função dos pontos de maior concentração, o que permite maiores discrepâncias na exatidão dos pontos de menores concentrações quando esses são comparados com os valores nominais (KARNES et al.,1991;Jackson,2000). Em nosso trabalho a aplicação do modelo de regressão ponderada possibilitou valores de desvios padrões inferiores a 15% para todos os calibradores, fato esse que contempla as determinações dos guias da ANVISA (2002) e F.D.A (1998) para o parâmetro de linearidade.

Os valores de limite de detecção (LD) para os esteróides analisados variaram de 1 a 15 ng/mL. Os agentes anabólicos que possuíam íons específicos com maior abundância apresentaram LD menores, como é o caso da norandrosterona (1.5 ng/mL) e oximesterona (0.5 ng/mL). Os produtos de biotransformação do estanozolol apresentaram um valor alto de LD (15 ng/mL), pois apresentavam baixa abundância nos íons específicos monitorados (m/z = 545 e 560). Os valores de LD avaliados por Haber et al. (2001) para alguns esteróides anabólicos, apresentaram-se semelhantes aos obtidos neste trabalho, como é o caso do 3-hidroxi-estanozolol que apresentou valor de LD =

14 ng/mL em tal estudo. Muller (1999) demonstra que valores de LD inferiores a 5 ng/mL para os produtos de biotransformação do estanozolol só são obtidos com o uso de espectrômetros de massas de alta resolução. Os valores empíricos de CV menores a 20%, empregados neste estudo, para aceitação dos valores de LD foram propostos por Armbruster (1994) para ensaios analíticos em GC/MS com finalidade toxicológicas e também empregados em trabalhos de Yonamine (2000) e Campos, S (2002).

O limite de quantificação (LQ = 10 ng/mL) foi avaliado para os esteróides endógenos testosterona e epitestosterona, em função do íon de maior abundância ($m/z=432$), já que os valores de concentração obtidos a partir de uma curva de calibração foram utilizados no cálculo da razão T/E. O critério empírico de CV menor que 10% apresentou-se mais rigoroso que as normatizações do guia da ANVISA (2002) e F.D.A (1998) que pré-definem CV menor que 20% para LOQ. Além disso, foi obtido um valor de inexatidão menor que 20% em função do valor nominal (BRESSOLLE et al.,1996). Valores de LQ inferiores a 10 ng/mL para métodos que utilizaram condições operacionais do GC/MS semelhantes as aplicadas nesse estudo, só foram obtidos por meio de extração em fase sólida com colunas Sep-Pak C₁₈ (Millipore), como apresentado por Ayotte et al. (1996).

Os dados de precisão intra e inter-ensaios para os esteróides endógenos e exógenos apresentaram-se inferiores a 15%, demonstrando uma adequada repetibilidade e reprodutibilidade para o método de acordo com Causon (1997) e Jiménez et al. (2002). O estudo de Haber et al. (2001) apresenta valores de precisão para esteróides exógenos semelhantes aos obtidos nesse trabalho. Esse trabalho avaliou os resultados intra e inter-ensaios utilizando o método estatístico ANOVA – fator único, como sugerido por Bressolle et al. (1996) e empregado por Campos, S (2000).

A inexatidão intra e inter-ensaios foi avaliada apenas para os esteróides endógenos testosterona e epitestosterona a partir de amostras adicionadas de padrão (Causon,1997), visto que não foi possível obter amostras certificadas para cada esteróide avaliado. Porém, o estudo de inexatidão foi realizado de acordo com o preconizado no guia de validação da ANVISA (2002) e apresentou dados com variação inferiores a 15 %, mesmo para o LQ.

Os dados de recuperação obtidos para os esteróides anabólicos avaliados apresentaram-se superiores a 90%, fato esse que colabora para uma maior sensibilidade do método (CAUSON,1997; JIMÉNEZ et al., 2002). Entretanto, os produtos de biotransformação 16-beta-estanozolol e 9-alfa-F-17 apresentaram valores de recuperação inferiores a 50% corroborando com os dados obtidos por Haber et al. (2001) e Schanzer (1998).

O estudo de estabilidade foi conduzido com o objetivo de avaliar a integridade dos esteróides na matriz biológica e no extrato após a derivação, a partir de dados de amostras recém preparadas, de acordo com Causon (1997) e o guia da ANVISA (2002). A avaliação da estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento fez –se necessário, já que a amostra teste (denominada A pelo C.O.I) pode sofrer etapas de congelamento e descongelamento desde o momento da coleta até a emissão do laudo final, como por exemplo, descongelar-se durante o transporte para o laboratório (ciclo 01) e novamente ser recongelada até o momento da análise cromatográfica (ciclo 02). Porém, se a corrida analítica não apresentar parâmetros de acordo com o estabelecido na validação, a amostra deverá ser novamente descongelada e reanalisada (ciclo 03).

O estudo de estabilidade de curta duração foi realizado, pois a amostra teste pode permanecer congelada por um período de até 48 horas, já que esse é o período máximo estabelecido pelo C.O.I para a emissão de um laudo analítico. Nesse trabalho, os dois ensaios de estabilidade apresentaram dados de variação inferiores a 15% para todos os esteróides avaliados, como preconizado por Bressolle et al. (1996).

A avaliação da estabilidade nas condições de análise demonstrou variações inferiores a 10% para todos os esteróides, o que permite que amostras derivadas permaneçam à temperatura ambiente por até 12 horas, caso seja necessário uma reanálise. Também, deve-se considerar que o método validado, por permitir 3 análises por hora, possibilita que amostras derivadas permaneçam na bandeja do injetor por até 8 horas.

Esse estudo incluiu 20 sujeitos de pesquisa, número esse já adotado por outros protocolos, como os de Torres-Calleja et al. (2001), Small et al. (1984) e

Alén et al. (1987). Além disso, considerou-se a disponibilidade de atletas usuários de esteróides e o alto custo das análises de urina e sangue.

Na etapa analítica, a identificação dos esteróides nas amostras analisadas ocorreu a partir da comparação com os espectros de massas e o tempo de retenção relativo (TRR) obtidos dos padrões dos esteróides inalterados e/ou seus produtos de biotransformação, de acordo com Ventura et al. (2000) e Rivier (2003). Entretanto, como sabíamos previamente qual esteróide anabólico havia sido utilizado pelo voluntário por meio do questionário, a técnica da CG-MS aplicada neste estudo apresentou apenas caráter confirmatório e não de triagem, como geralmente utilizado em Programas de Controle de Dopagem no Esporte.

A análise das amostras de urina dos voluntários usuários de esteróides demonstrou uma correlação com os dados de uso avaliados pelo questionário aplicado na fase de seleção, uma vez que para os voluntários usuários estanozolol (I.M), os produtos de biotransformação desse esteróide foram identificados nas amostras de urina avaliadas. Além disso, o estanozolol inalterado é excretado em baixa concentração na urina, não sendo detectado nem com técnicas mais sensíveis de acordo com Chung et al. (1990). Além disso, os voluntários 05, 06 e 10 apresentaram razão T/E superior a 6 (C.O.I, 2003), já que fizeram uso de ésteres de testosterona (I.M). O cálculo dessa razão pôde ser realizado após a determinação da concentração de cada analito.

Além disso, observou-se nos usuários de estanozolol uma diminuição da razão androsterona/etiocolanolona (A/E) quando comparados com não usuários. Esse fato já havia sido observado durante a rotina analítica do Programa de Controle de Dopagem do LAT, porém só foi confirmado após a leitura dos artigos de Norli et al. (1995) e Marques et al. (2003) que propõem que essa diminuição na razão A/E ocorra por um mecanismo de retroalimentação negativo do eixo hipofisário promovido por esteróides exógenos. Além disso, Alén et al. (1987) afirmam que tal estado hipogonadal levaria a diminuições séricas de testosterona, seus precursores e produtos de biotransformação.

Dos parâmetros séricos avaliados nesse estudo somente os dados de HDL, LDL, LH e FSH apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados com o grupo controle. O método estatístico utilizado foi o Teste t para amostras não pareadas. O método apresentou-se adequado para comparar as médias dos grupos, pois o número de observações foi pequeno e apresentou distribuição normal após a aplicação do método de Kolmogorov-Smirnov. Em bioestatística, grupos com menos de 30 indivíduos são considerados como amostras pequenas. O teste de variância ANOVA poderia ser utilizado, porém esse teste é mais efetivo para comparar amostras grandes ou mais de 2 populações (VIEIRA,1998). Estudos como de Alén et al. (1987) utilizaram o Teste t para comparar os dados bioquímicos e endócrinos entre grupos de usuários e não usuários de esteróides.

Esse estudo clínico demonstrou aumento nos níveis séricos de LDL-c e queda nos de HDL-c dos usuários de esteróides anabólicos quando comparados com os não usuários. Esse tipo de efeito adverso é o mais relatado pela literatura para o uso ilícito ou terapêutico de esteróides. Os trabalhos de Urhassen et al. (2003), Lenders et al. (1988) e Anderson et al. (1995) demonstram semelhantes alterações para atletas que utilizam doses supra-terapêuticas de esteróides e o estudo de Ferreira et al. (1998) para doses terapêuticas, utilizadas no manejo de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica.

Acredita-se que alterações bioquímicas sejam as causas moleculares para a alteração nos níveis de LDL-c e HDL-c em usuários de esteróides androgênicos. De acordo com Kantor et al. (1985) e Shepherd (1995), respectivamente, os esteróides estimulam a atividade da enzima glicerol lipase hepática responsável pelo catabolismo do HDL-c e a transformação de VLDL em LDL-c. Outros autores, como Hazzard et al. (1984) também propõe que tais alterações estejam relacionadas com inibições na síntese de determinadas apoproteínas. Entretanto, esse efeito adverso é reversível após um período de algumas semanas ou meses de interrupção do uso desses agentes anabolizantes (URHAUSEN et al., 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a elevação dos valores das razões colesterol total/ HDL-c e LDL-c/HDL-c determinam aumento no risco de eventos cardiovasculares devido a aterosclerose (ALÉN et al., 1985). Assim,

McCarthy et al. (2000), Madea e Grellner (1998) e Rockhold (1993) relatam casos clínicos de óbitos de usuários crônicos de esteróides por aterosclerose, trombose ventricular e infarto agudo do miocárdio.

Nosso estudo demonstrou valores muito acima dos estipulados por Castelli et al. (1987) para os riscos I e II e pelas Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (2001), para os parâmetros HDL-c e LDL-c. Esse fato permitiu inferir que indivíduos que utilizam esteróides anabólicos em doses supra-terapêuticas e por longos períodos, apresentam um alto risco de morbimortalidade relacionada a problemas cardiovasculares. Por isso, trabalhos como o de Madea e Grellner (1998) sugerem que médicos cardiologistas considerem em suas anamneses, no caso de pacientes jovens com evidências clínicas de hipercolesterolemia ou hipertrofia cardíaca, a possibilidade do uso crônico de esteróides anabólicos androgênicos.

Os parâmetros hormonais LH e FSH apresentaram-se também alterados nos indivíduos usuários de esteróides avaliados nesse trabalho. A queda dos níveis séricos de LH e FSH são explicados devido ao “feed-back” negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise, promovido pela alta concentração sanguínea de esteróides (TORRES-CALLEJA et al,2001). Small et al. (1984) inferiram que a inibição crônica do eixo hipofisário, caracterizado clinicamente por longos períodos de azoospermia, podem determinar quadros de infertilidade irreversíveis. Entretanto, a literatura científica ainda não apresentou dados conclusivos sobre esse tema.

O presente trabalho não avaliou parâmetros citológicos relacionados a produção de espermatozóides, já que artigos como os de Torres-Calleja et al. (2000;2001), Alén et al. (1984;1987), Darly et al. (2003) e Van Breda et al. (2003) descrevem alterações de motilidade e oligospermia em usuários de esteróides, como também a reversibilidade de tais evidências clínicas após 4 a 7 meses de interrupção do uso. Além disso, considerou-se a dificuldade de inclusão de voluntários caso tal parâmetro viesse a ser analisado.

Apesar desse protocolo clínico não demonstrar diferenças estatisticamente significantes nos níveis de estradiol dos usuários de esteróides anabólicos em relação aos não usuários, observaram-se valores acima dos de normalidade (56 pg/mL) para os voluntários 05, 06 e 10, os

quais fizeram uso de testosterona (I.M). De Luis et al. (2001) descrevem que doses supra-fisiológicas de testosterona propiciam o aumento sérico desse hormônio, e conseqüentemente, aromatização enzimática do mesmo a estradiol. Os trabalhos de Alén et al. (1987), Iñigo et al. (2000), Torres-Calleja et al. (2001) e Urhausen et al. (2003) apresentam dados semelhantes para os níveis sanguíneos de estradiol em usuários de testosterona exógena. Além disso, o voluntário 06 que apresentou evidências anatômicas de ginecomastia e suspeita de neoplasia na mama direita, também apresentava o maior nível sérico de estradiol (106.6 pg/mL) e níveis de prolactina acima da normalidade (18 ug/L; Valores de Referência: 2 – 10 ug/L).

Em relação aos efeitos tóxicos sobre o sistema hepático, Lenders et al. (1988) e Urhausen et al. (2003) descrevem aumento nos níveis de transaminases hepáticas associado ao uso crônico de esteróides anabólicos. Além disso, Boada et al. (1999) apresentam dados pré-clínicos sobre tais alterações relacionados ao uso de estanozolol, os quais foram confirmados pelo estudo clínico de Pärssinen e Seppala (2002), que correlacionam o uso de tal esteróide com episódios de carcinoma hepatocelular, colestase e hepatite. Entretanto, com a interrupção do uso de esteróides anabólicos, os níveis de TGO e TGP tendem a normalidade após um período de 5 meses (Lenders et al., 1988). Em nosso estudo não foi observado alterações desses parâmetros hepáticos, já que os indivíduos estudados faziam uso de estanozolol por via intramuscular, o que nos permitiu inferir que tal via de administração determinou um menor efeito de primeira passagem em relação ao uso oral dessa substância.

Os dados obtidos por meio dos questionários aplicados na etapa de inclusão do estudo, permitiram evidenciar que os esteróides anabólicos mais utilizados foram estanozolol e testosterona, por via intramuscular (I.M). Esses dados corroboram com os obtidos por Lobo et al. (2003) e Moreau e Silva (2003). Além disso, 3 voluntários apresentaram resultados positivos para canabinóides na triagem para drogas e/ou fármacos de abuso. Dados semelhantes foram relatados por Meilman et al. (1995) e Wichstrom e Pederson (2001), quanto do uso de substâncias ilícitas associadas aos esteróides anabólicos. No caso do uso de maconha, Campos, D et al. (2003)

inferiu que achados analíticos como esses, podem refletir uma situação social, visto que tal substância não apresenta características ergogênicas.

Em relação aos padrões de uso, o questionário evidenciou 2 tipos neste trabalho: a pirâmide, que se caracteriza pelo uso de doses crescentes do esteróide anabólico até o final do primeiro período (1º e 2º semanas), seguidas por doses decrescentes até o final do segundo período (final do ciclo), e, o irregular, que se caracteriza por seqüências de uso determinadas aleatoriamente, dependendo da finalidade pretendida. O padrão irregular foi o utilizado pela maioria dos voluntários (60%) alocados neste estudo. Esse dado apresenta-se semelhante ao evidenciado por Iriart e Andrade (2002), em estudo epidemiológico com jovens fisiculturistas de Salvador, Bahia. Entretanto, o padrão de uso em pirâmide apresenta-se também em destaque, já que foi utilizado por 40% dos voluntários e é a série de uso pré-estabelecida mais descrita pela literatura.

Observou-se também, que ao final de cada ciclo, alguns voluntários narraram a utilização dos “protetores”, isto é, fármacos utilizados com a crença de atenuarem e/ou inibirem os efeitos adversos decorrentes de doses supra-terapêuticas de esteróides anabólicos. Foram relatados o uso de tamoxifeno (Nolvadex®), para evitar o desenvolvimento de ginecomastia (SPANIO; RYAN, 1984), bem como de clomifeno (Clomid®) e gonadotrofina coriônica (Prófase 5000®), com o objetivo de reestabelecer os níveis séricos de testosterona e LH (Tan, 2003). A utilização de tais substâncias, também foram relatadas pelos esportistas entrevistados no artigo de Moreau e Silva (2003).

Outro dado de suma importância refere-se aos locais de obtenção dos esteróides anabólicos descritos pelos entrevistados. Esses não apresentaram nenhum fato que limitasse a oferta e a aquisição dos esteróides, tanto em farmácias (sem receita médica), como em lojas de suplementos alimentares e academias. Fatos semelhantes foram narrados pelos sujeitos de pesquisa avaliados por Iriart e Andrade (2002), Lobo et al. (2003) e Moreau e Silva (2003), o que evidencia falhas nos mecanismos de fiscalização sanitários regulamentados pela Portaria 344/98 (Ministério da Saúde) e Lei 9.965/00 (ANVISA), descritas no item 1 dessa dissertação. Assim, campanhas educacionais que alertem sobre os efeitos nocivos do uso de esteróides

anabólicos desenvolvidas pelo Ministério da Saúde e providências que visem coibir a venda de tais substâncias, implementadas pelas Secretarias de Vigilância Sanitárias Estaduais e Municipais, fazem-se necessárias não só no Estado de São Paulo, como também em todo território nacional.

7. CONCLUSÕES

- O método validado em GC-MS para a detecção e quantificação de esteróides androgênicos anabólicos em amostras de urina apresentou parâmetros analíticos adequados para a aplicação em Programas de Controle de Dopagem no Esporte e compatíveis com os utilizados pelos laboratórios credenciados pelo C.O.I;
- Os dados séricos dos voluntários usuários de esteróides anabólicos (grupo teste) quando comparados com os não usuários (grupo controle) demonstraram alterações nos perfis lipoprotéicos, com aumento de risco de eventos cardiovasculares evidenciados pelos valores de Castelli, bem como alterações nos níveis dos hormônios gonadotróficos.
- Os questionários demonstraram, para o grupo teste, diferentes padrões de uso para os esteróides anabólicos, os quais eram obtidos em farmácias (sem receita médica) e lojas de suplementos alimentares, como também eram utilizados em associação com fármacos e/ou drogas de abuso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, R.; BECCHI, M.; GRENOT, C.; CASABLANCA, H.; HATTON, C.K. Detection of testosterone misuse: comparison of two chromatographic sample preparation methods for gas chromatographic-combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.687, n.1, p. 43-53, 1996

ALEN, M.; RAHKILA, P. Anabolic androgenic steroid effects on endocrinology and lipid metabolism in athletes. *Sports Med.*, Auckland, v.6, p.327-332, 1988

ALEN, M.; RAHKILA, P.; MARNIEM, J. Serum lipids in power athletes self-administering testosterone and anabolic steroids. *Int. J. Sports. Med.*, Stuttgart, v.6, p.139-144, 1985

ALEN, M.; RAHKILA, P.; REINILA, M. Androgenic anabolic steroid effects on serum thyroid, pituitary and steroid hormones in athletes. *Am. J. Sport. Med.*, Baltimore, v.15, n.4, p.357-361, 1987

AMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/limit of quantification (LOQ): comparison of the empirical and statistical methods exemplified with GC-MS assay of abused drugs. *Clin. Chem.*, Baltimore, v.40, n.7, p.1233-1238, 1994

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE – Anabolic steroids. Disponível em: <http://www.acsm.org/health+fitness/comments.htm>. Acesso em: 29 de abr 2003

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical manual of mental disorders - DSM-III-R. 3 ed. Washington, 1997

ANDERSON, R.A.; WALLACE, E.M.; WU, F.C.W. Effect of testosterone enanthate on serum lipoproteins in man. *Contraception*, Stoneham, v.52, p.115-119, 1995

ANSELL, J.E.; TLARKS, C.; FAIRCHILD, V.K. Coagulation abnormalities associated with the use of anabolic steroids. *Am. Heart J.*, Saint Louis, v.125, p.367, 1993

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 475, de 02 de março de 2002. Guia para Validação de Métodos Analíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 de jun. 2002

AYOTTE, C.; GOUDREAU, D.; CHANLEBOIS, A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.687, p.3-25, 1996

BAGATELI, C.J.; BREMNER, W.J. Androgens in men – uses and abuses. *N. Engl. J. Med*, Boston, v. 334, n.11, p. 707-714, 1996

BAHRKE, M.S.; YESALIS, C.E.; WEIGHT, J.E. Psychological and behavioural effects of endogenous testosterone levels and anabolic androgenic steroids among males: An update. *Sports Med.*, Auckland, v.22, p.367-390, 1996

BHASIN, S.; STORER, T.W.; BERMAN, N.; CALLEGARI, C. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.335, p.1-7, 1996

BIOANALYTICAL METHODS VALIDATION FOR HUMAN STUDIES. Draft Guidance – CDER – 1998. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/>. Acesso em: 18 de jun 2002

BOADA, L.D.; ZUMBADO, M.; TORRES, S.; LOPEZ, A.; DIAZ-CHICO, B.N.; CABRERA, J.J.; LUZARDO, O.P. Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. *Arch. Toxicol.*, New York, v.73, p. 465-472, 1999

BOLDING, G.; SHERR, L.; ELFORD, J. Use of anabolic steroids and associated health risks among gay men attending London gyms. *Addiction*, Oxfordshire, v.97, n.2, p.195-203, 2002

BOWERS, L.D. Abuse of performance-enhancing drugs in sport. *Ther. Drug. Monit.*, New York, v.24, n.1, p.178-181, 2002

BOWERS, L.D. Analytical advances in detection of performance-enhancing compounds. *Clin. Chem.*, Baltimore, v.43, n.7, p.1299-1304, 1997

BOWERS, L.D.; BORTS, D.J. Separation and confirmation of anabolic steroids with quadrupole ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v.687, p.69-78, 1996

BRAGGIO, S.; BARNABY, R.J.; GROSSI, P.; ARGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.14, p.375-388, 1996

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAM, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v.686, p.3-10, 1996

BROWER, K.J.; CATLIN, D.H.; BLOW, F.C.; ELIOPULOS, G.A. Clinical assessment and urine testing for anabolic androgenic steroid abuse and dependence. *Am. J. Drug. Alcohol. Abuse.*, New York, v.17, n.2, p.161-171, 1991

CAMPOS, D.R.; YONAMINE, M.; DE MORAES MOREAU, R.L. Marijuana as doping in sports. *Sports Med.*, Auckland, v.33, n.6, p. 395-399, 2003

CAMPOS, S.V. Avaliação da exposição à cocaína através da análise toxicológica em urina. São Paulo, 2002, 120p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)

CASTELLI, W.P.; ABBOT, W.D.; MCNAMARA, P.M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation.*, Baltimore, v.67, p.730-734, 1983

CASTILHO, E.G. Critérios de positividade para a análise de esteróides anabólicos androgênicos por GC/MS em urina de atletas. São Paulo, 2001, 159p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)

CAUSON, R. validation of chromatographic methods in biomedical analysis. View point and discussion. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v.689, p.175-180, 1997

CAZENAVE, S.O.S.; WAGNER, G.A. Fundamentação para elaboração de um projeto preventivo ao uso de esteróides anabólicos. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.16, n.1 (supl), p. 246, 2003 (Apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia)

CHANG, K.H. Avaliação da Bioequivalência de comprimidos contendo hidroclorotiazida. São Paulo, 2002, 188p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)

CHUNG, B.C.; CHOO, H.Y.P.; KIM, T. PARK, J. Analysis of anabolic steroids using GC/MS with selected ion monitoring. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.14, p.91-95, 1997

COHEN, J.C.; FABER, W.M.; BEUADE, A.J.; NOAKES, T.D. Altered serum lipoprotein profiles in male and female power lifters ingesting anabolic steroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Baltimore, v.64, p.960, 1987

COMITÊ OLÍMPICO BRASILEIRO. Uso de medicamentos no esporte. Disponível em: http://www.cob.org.br/site/sobre_cob/comissao_medica.asp. Acesso em: 20 de jun 2003

CONCEIÇÃO, C.A.; WANDER, F.S.; MASSILI, L.P.; FOSSATI, G. Uso de anabolizantes entre praticantes de musculação em academias. *Revista Pesquisa Medica*, Fortaleza, v.33, p.103-116, 1999

CUTOLO, M. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, Atlanta, v.34, p.1-5, 1991

DARLY, R.C.; SU, T.P.; PAGLIANO, M.; RUBINOU, D.R. Neuroendocrine and behavioral effects of high-dose anabolic steroid administration in male normal volunteers. *Psychoneuroendocrinology*, Oxford, v.28, n.3, p.317-331, 2003

DE LA TORRE, R.; SEGURA, J. Testing for drugs of abuse. *Lancet*, London, v.346, n.896, p.119, 1995

DE LA TORRE, X.; SEGURA, J.; POLETTTINI, A. Detection of testosterone esters in human plasma. *J. Mass. Spectrom.*, Chichester, v.30, p.1393-1404, 1995

DE LUIS, D.A.; ALLER, R.; CUELLAR, L.A. Anabolizantes esteroides y ginecomastia. Revisión de la literatura. *Am. Med. Intern.*, Philadelphia, v.18, n.9, p.489-491, 2001

DELBEKE, F.T.; DESMET, N.; DEBACKERE, M. The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993). *Int. J. Sports. Med.*, Stuttgart, v.16, p.66-70, 1995

DELIGIANNIS, A.P.; MANDROUKAS, K. Noninvasive cardiac evaluation of weight lifters using anabolic steroids. *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, Odense, v.3, p.37-40, 1992

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.25, p.1017, 1984

FERREIRA, I.M.; VERRESCHI, I.T.; NERY, L.E; GOLDSTEIN, R.S.; ZAMEL, N.; BROOKS, D.; JARDIN, J.R. The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body man and respiratory muscles in undernourished COPD patients. *Chest.*, Chicago, v.114, p.19-28, 1998

FRIEDL, K.E.; HANNAN, C.J.; JONES, R.E.; PLYMATE, S.R. High-density lipoprotein cholesterol is not decreased if an aromatizable androgen is administered. *Metabolism.*, Baltimore, v.39, p.69-74, 1990

FUJIOKA, M.; SHIOHARA, Y.; BABA, S. Pharmacokinetics properties of testosterone propionate in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Baltimore, v.63, p.1361-1364, 1986

GAMBELUNGHE, C.; SOMMAVILLA, M.; POSSI, R. Testing for nandrolone metabolites in urine samples of professional athletes and sedentary subjects by GC/MS/MS analysis. *Biomed. Chromatogr.*, Amsterdam, v.16, n.18, p.508-512, 2002

GEORGAKOUPoulos, C.G; TSITISIMPIKOU, C; SPYRIDAKI, M.H. Doping control analysis: The 6 th World Championships of Athletics, Athens, Greece. *Trends. Anal. Chem.*, Amsterdam, v.18, n.1, p.1-13, 1999

GERHARDS, P.; BONS, V.; SAWAZKI, J.; SZIGAN, J.; WERTMANN, A. GC/MS in clinical chemistry. 1ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 241p.

GLADER, G.; SUCHMAN, A.L. Lack of demonstrated effect of nandrolone on serum lipids. *Metabolism*, Baltimore, v.43, p.204, 1994

GOUDREAU, D.; MASSE, R. Studies on anabolic steroids – 4. Identification of new urinary metabolites of methenolone in human by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, Oxford, v.37, n.1, p.137-154, 1990

GREEN, G.A.; URYASZ, F.D.; BRAY, C.D. NCAA study of substance use and abuse habits of college student – athletes. *Clin. J. Sport. Med.*, New York, v.11, p.51-56, 2001

GUYTON, A.C. Fisiologia Humana. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998, 564p.

HABER, E.; MUNÓZ-GUERRA, J.A.; SORIANO, C.; CARRERAS, D. Automated sample preparation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary androgenic anabolic steroids. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.755, p.17-26, 2001

HAZZARD, W.R; KUSHWAHA, R.S.; FOSTER, D.M. Chylomicron and very low-density lipoprotein apolipoprotein B metabolism: mechanism of the response to stanozolol in a patient with severe hypertriglyceridemia. *Metabolism*, Baltimore, v.33, n.10, p.873-881, 1984

HERVEY, G.R.; HUTCHINSON, I.; KNIBBS, A.V.; JONES, P.R. "Anabolic" effects of methandienone in men undergoing athletic training. *Lancet*, London, v.2, p.699-702, 1976

HOLMA, P.K. Effects of an anabolic steroid (metandienone) on spermatogenesis. *Contraception*, Storeham, v.15, n.2, p.151-162, 1977

INGEROWSKI, G.H; SCHEUTWINKEL-REICH, M.; STAN, H.J. Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the Salmonella/microsome test. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.91, n.2, p.93-98, 1981

IÑIGO, M.A; ARRIMADAS, E.; ARROYO, D. Estudio de 43 ciclos de tratamiento con anabolizantes esteroideos en deportistas: usos y efectos secundarios. *Rev. Clín. Esp.*, Madrid, v.200, n.3, p.133-138, 1999

INTERNATIONAL OLYMPIC COMMITTEE. Prohibited classes of substances and prohibited methods. Disponível em: http://www.usantidoping.org/prohibited_sub/list.asp. Acesso em: 20 de jun 2003

IRIART, J.A.B.; ANDRADE, T.M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n.5, p.1379-1387, 2002

JACKSON, A. J. generics and Bioequivalence. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2000

JIMÉNEZ, C.; VENTURA, R.; SEGURA, J. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.767, p. 341-351, 2002

JOCKENHOVEL, F.; VOGEL, E.; KREUTZER, M. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of subcutaneous testosterone implants in hypogonadal men. *Clin. Endocrinol.*, Oxford, v.45, p.61-71, 1996

JULIEN R.M. A Primer of Drug Action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs. 8ed. New York: W. H Freeman and Company, 1997. 548p.

KANAYAMA, G.; GRUBER, A.J.; POPE JR, H.G. Over the counter drug use in gymnasiums: an underrecognized substance abuse problem ? *Psychother. Psychosom*, Stuttgart, v.70, p.137-140, 2001

KANTOR, M.A.; BIANCHIM, A.; BERNIER, D.; SANDY, S.P.; THOMPSON, P.D. Androgens reduce HDL 2-cholesterol and increase hepatic triglyceride lipase activity. *Med. Sci. Sports. Exerc*, Hagestown, v.17, p.462-465, 1985

KARCH, S.B. Drug Abuse Handbook. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 1998, 1138p.

KARILA, T. Adverse effects of anabolic androgenic steroids on the cardiovascular, metabolic and reproductive systems of anabolic substance abusers. Helsinki, 2003, 66p. (Academic Dissertation – University of Helsinki)

KARIM, A.; RANNEY, R.E.; ZAGANELLA, J. Oxandrolone disposition and metabolism in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, Saint Louis, v.14, p.862-869, 1973

KARNES, H.T; SHIU, G.; SHAH, V.P. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharm. Res.*, New York, v.8, n.4, 1991

KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 1054p.

KENNEDY, M.C; LAURENCE, C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med. J. Austr.*, Sidney, v.158, p.346-348, 1993

KINDLUNDH, M.A.S.; ISACSON, D.G.R.; NYBERG, F. Factors associated with adolescent use of doping agents: anabolic-androgenic steroids. *Addiction*, Oxfordshire, v. 94, p.543-553, 1999

KINTZ, P.; CIRIME, V.; LUDES, B. Identification of testosterone and testosterone esters in human hair. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, n.5, p.352-356, 1999

KITSON, F.G.; LARSEN, B.S.; MCEWEN, C.N. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide. 1ed. San Diego: Academic Press, Inc, 1996. 381p.

KLAASEN, C.D. Casarett&Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 15ed. New York: Mc Graw-Hill, 1996, 1111p.

KOCH, J.J. Performance-enhancing: substances and their use among adolescent athletes. *Pediatr. Rev.*, New York, v.23, n.9, p.310-317, 2002

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

KUTSCHER, E.C.; LUND, B.C.; PERRY, P.J. Anabolic Steroids. *Sports Med.*, Auckland, v.35, n.5, p.285-296, 2002

LANDON, J.; WYNN, V.; COOKE, J.N.; KENNEDY, A. Effects of anabolic steroid methandienone on carbohydrate metabolism in man. *Metabolism.*, Baltimore, v.11, p.501-512, 1962

LENDERS, J.W.M; DEMACKER, P.N.M.; HORTSMAN, A.J.; THIEN, T. Deleterious effects of anabolic steroids on serum lipoproteins, blood pressure, and liver function in amateur body builders. *Int. J. Sports. Med.*, Stuttgart, v.9, p.19-23, 1988

LESNA, M.; TAYLOR, W. Liver lesions in BALBK mice induced by an anabolic androgen (decadurabolin) with and without pretreatment with diethylnitrosamine. *J. Steroid. Biochem.*, Elmsford, v.24, n.1, p.449-453, 1986

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, London, v.420, p.868-874, 2002

LISE, M.L.; DA GAMA E SILVA, T.S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M. Abuse of anabolic-androgenic steroids in sports. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, Sao Paulo, v.45, n.4, p.364-370, 1999

LOBO, A.P.T.; NAPPO, S.A.; SANCHEZ, Z.V.D.; CARLINI, E.A. O uso indevido de anabolizantes na cidade de São Paulo: um estudo qualitativo. *J. Bras. Psiquiatr.*, Rio de Janeiro, v.1, p.25-34, 2003

LUCKE, J.L.; FARB, A.; VIRMANI, R.; SAMPLE, R.H. Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: pathological and toxicology findings. *J. Forensic. Sci.*, Philadelphia, v.35, p.1441-1447, 1990

LUSIS, A. Atherosclerosis. *Nature.*, London, v.407, p.233-241, 2000

MACINDOE, J.H.; PERRY, P.J.; YATES, W.R.; HOLMAN, T.L. Testosterone suppression of the HPT axis. *J. Investig. Med.*, Thorofare, v. 45, n.8, p.441-497, 1997

MADEA, B.; GRELLNER, W. Long-term cardiovascular effects of anabolic steroids. *Lancet*, London, v.352, p.33, 1998

MARQUES, M.A.S.; PEREIRA, H.M.G.; NETO, F.R.A. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Rev. Bras. Med. Esporte*, Sao Paulo, v.9, n.1, p. 15-24, 2003

MASSE, R.; AYOTTE, C.; DUGAL, R. Studies on anabolic steroids. I. Integration methodological approach to the gas chromatographic/mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.489, v.23, 1989

MATSUDA, K.; MATHUR, R.S.; DUZIC, E.; HALUSHKA, P.V. Androgen regulation of thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor expression in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.*, Baltimore, v.265, p.E928, 1993

MCCARTHY, K.; TAREG, A.T.; HAW, M.P. Ventricular thrombosis and systemic embolism in bodybuilders: etiology and management. *Ann. Thorac. Surg.*, Boston, v.70, n.2, p.658-660, 2000

MEILMAN, P.W.; CRACE, R.K.; PRESLEY, C.A.; LYERLA, R. Beyond performance enhancement: polypharmacy among collegiate users of steroids. *J. Am. Coll. Health*, New York, v.44, n.3, p.98-104, 1995

MICROMEDEX. Drug Dex. Disponível em: <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/login?&action=bye>. Acesso em: 20 de agosto de 2003.

MESSERLI, F.H.; FROHLICH, E.D. High blood pressure: a side effect of drugs, poisons and food. *Arch. Int. Med.*, Chicago, v.139, p.682-687, 1979

MOREAU, R.L.M.; SILVA, L.S.M.F. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.39, n.3, p.327-333, 2003

MOREAU, R.L.M.; SILVA, L.S.M.F. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.2 (supl), p.70, 2001 (Apresentado no XII Congresso Brasileiro de Toxicologia)

MOTTRAM, D.; GEORGE, A.J. Anabolic steroids. *Baillière's. Clin. Endocrinol. Metabol.*, London, v.14, n.1, p.55-69, 2000

MULLER, R.K.; GROSSE, J.; THIEME, D.; LANGE, R. Introduction to the application of capillary gas chromatography of performance enhancing drugs in doping control. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, v.843, p.275-285, 1999

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. Applied Linear Regression Models. Ed. Illinois: Richard D. Irwin, 1983.

NORLI, H.R.; ESBENSEN, K.; WESTAD, F.; BRIKELAND, K.I.; HEMMERSBACH, P. Chemometric evaluation of urinary steroid profiles in doping control. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, Oxford, v.54, n.1/2, p.83-88, 1995

OVERLY, W.L.; DANKOFF, J.A.; WANG, B.K. Androgens and hepatocellular carcinoma in the athlete. *Ann. Intern. Med.*, Boston, v.100, p.158, 1984

OZER, D.; TEMIZER, A. The determination of nandrolone and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, Paris, v.22, n.4, p.421-425, 1997

PARISSOTO, R.; GONE, C.J.; EMSLIE, K.R. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Hematologica*, Pavia, v.85, p.564-572, 2000

PARSSINEN, M.; SEPPALA, T. Steroid use and long-term health risks in former athletes. *Sports. Med.*, Auckland, v.32, n.2, p.83-94, 2002

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001, 703p.

RIVIER, L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.492, p. 69-82, 2003

ROCKHOLD, R.W. Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v.33, p.497-520, 1993

SADRAY, S.; REZACE, S.; REZAKHAH, S. Non-linear heteroscedastic regression model for determination of methotrexate in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, v.787, p.293-302, 2003

SCHANZER, W. Detection of exogenous anabolic androgenic steroids. In: KARCH, S. B. *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. cap. 9, p.671-689

SCHANZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.*, Baltimore, v.42, n.7, p.1001-1020, 1996

SCHANZER, W.; DONIKE, M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.275, p.23-48, 1993

SCHOLS, A.M.; SOETERS, P.B.; MOSTERT, R.; PLUYMERS, R.J.; WOUTERS, E.F. Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A placebo controlled randomized trial. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.*, New York, v.152, p.1268-1274, 1995

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedure for gas chromatographic –mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v.713, p.61-90, 1998

SHEPERD, J. Danazol and plasma lipoprotein metabolism. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, New York, v.50, suppl. 1, p.523-526, 1995

SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M.A. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev. Bras. Med. Esporte.*, Sao Paulo, v.8, n.6, p.235-243, 2002

SMALL, M.; BEASTALL, G.H; SEMPLE, C.G.; CORVAN, R.A.; FORBES, C.D. Alteration of hormone levels in normal males given the anabolic steroid stanozolol. *Clin. Endocrinol.*, Oxford, v.21, p.49-55, 1984

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.77, supl. III, p.1-48, 2001

SPANO, F.; RYAN, W.G. Tamoxifen for gynecomastia induced by anabolic steroids ? *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.311, p. 861-862, 1984

SPUNGER, A.M.; GRIMM, D.R.; STRAKHAN, M.; PIZZOLATO, P.M.; BAUMAN, W.A. Treatment with an anabolic agent is associated with improvement in respiratory function in persons with tetraplegia: a pilot study. *Mt. Sinai. J. Med.*, v.66, p.201-205, 1999. *apud* BASARIA, S.; WASHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Anabolic androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Baltimore, v.86, n.11, p.5108-5117, 2001

TAN, R.S.; VASUDEVAN, D. Use of clomiphene citrate to reverse premature andropause secondary to steroid abuse. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.79, n.1, p. 203-205, 2003

THIBLIN, I.; LINDQUIST, O.; RAJS, J. Cause and manner of death among users of anabolic androgenic steroids. *J. Forensic. Sci.*, Philadelphia, v.45, n.1, p.16-23, 2000

THOMPSON, P.D.; CALINANE, E.M.; SADY, S.P.; CHENEVERT, C.; SARITELLI, A.L.; SADY, M.A.; HERBERT, P.N. Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.261, p.1165-1168, 1989

TORRES-CALLEJA, J.; DE CELIS, R.; GONZALEZ-UNZAGA, M.; PEDRÓN-NUEVO, N. Effect of androgenic anabolic steroids on semen parameters and hormone levels in bodybuilders. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.74, n.5, p.1055-1056, 2000

TORRES-CALLEJA, J.; GONZALEZ-UNZAGA, M.; PEDRÓN, N. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. *Life Sciences*, Elmsford, v.68, p.1769-1774, 2001

URHAUSEN, A.; TORSTEN, A.; WILFRIED, K. Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic androgenic steroid abusers. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, Oxford, v.84, p.369-375, 2003

VAN BREDA, E.; KEIZER, H.A.; KUIPERS, H. Androgenic anabolic steroid use and severe hypothalamic-pituitary dysfunction: a case study. *Int. J. Sports. Med.*, Stuttgart, v.24, n.3, p.195-196, 2003

VENTURA, R.; DAMASCENO, L.; FARRÉ, M.; CARDOSO, J.; SEGURA, J. Analytical methodology for the detection of β_2 – agonists in urine by gas chromatography-mass spectrometry for application in doping control. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.418, p. 79-92, 2000

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. 3ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998, cap.12, p.121-130.

WELDER, A.; ROBERTSON, J.W.; MELCHORT, R.B. Toxic effect of anabolic androgenic steroids in primary rat hepatic cell cultures. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, New York, v.33, p.187, 1995

WICHSTROM, L.; PEDERSON, W. Use of anabolic androgenic steroids in adolescence: winning, looking good or being bad ? *J. Stud. Alcohol.*, Piscataway, v.62, p. 5-13, 2001

WIJNAND, H.P.; BOSCH, A.M.; DONKER, C.W. Pharmacokinetics parameter of nandrolone after intramuscular administration of nandrolone decanoate to healthy volunteers. *Acta. Endocrinol. Suppl.*, Copenhagen, v.271, p.19-30, 1985

WILSON, J.D. Androgênios. In: Goodman&Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. pg 1069-1081.

WOODARD, T.L.; BURGHEN, G.A.; KITABCHI, A.E. Glucose intolerance and insulin resistance in aplastic anemia treated with oxymetholone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Baltimore, v.53, p.905-908, 1981

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the use of androgens in men. 1ed. Geneva, 1992. p.69

YESALIS, C.E. Anabolic Steroids in sports and exercise. 2ed. Champaign: Human Kinetics, 2000, 493p.

YONAMINE, M. Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas. São Paulo, 2000, 96p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)

YOON, J.M.; LEE, K.H. Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of conjugated steroids in urine. *J. Biosci.*, Osaka, v.26, n.5, p.627-634, 2001