

RELAÇÃO ANABÓLICA ANDROGÊNICA E EFEITOS ADVERSOS DA 5 α -HIDROXI LAXOGENINA EM RATOS TREINADOS

ANABOLIC ANDROGENIC RELATION AND ADVERSE EFFECTS OF 5 α -HYDROXY LAXOGENIN IN TRAINED RATS

Tiago Rodrigo Kutchenko Padilha¹, Álvaro Antônio Felipe Soares², Fernanda Losi Alves de Almeida³, Pollyana Mayara Nunhes⁴, Vanessa Lara Rissi Sabino², Maria Montserrat Diaz Pedrosa⁵, Rosângela Fernandes Garcia^{5*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ²Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ³Departamento de Ciências Morfológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ⁴Departamento de Educação Física, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; ⁵Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

*Autor correspondente: Maria Montserrat Diaz Pedrosa – Email: mmdpfurlan@uem.br

Recebido: 21 out. 2024

Aceito: 12 dez. 2024

Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que o trabalho original seja corretamente citado.



RESUMO: A 5 α -hidroxi laxogenina (5 α -HL) vem sendo inadvertidamente usada para melhoria de desempenho, embora relatos sobre suas ações anabólicas e/ou androgênicas em humanos saudáveis ou modelos animais não sejam encontrados. A 5 α -HL (grupo THL) foi comparada com Oxandrolona (OX, grupo TOX) ou veículo (óleo mineral, grupo TCN), administrados oralmente por seis semanas a ratos Wistar machos submetidos a treinamento resistido em escada vertical. Independentemente do tratamento, o treinamento melhorou o desempenho, registrado pela carga máxima. A 5 α -HL e a OX afetaram os lipídios plasmáticos, aumentaram o ganho de massa muscular (THL) e o diâmetro das fibras (TOX) sem afetar massa corporal, homeostase da glicose ou adiposidade. A 5 α -HL, ao contrário da OX, não causou atrofia dos órgãos reprodutores. A 5 α -HL teve uma relação anabólica androgênica melhor do que a OX neste modelo. Contudo, seus efeitos adversos, e seu efeito nulo sobre o desempenho, não sustentam seu uso seguro por humanos saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Brassinosteroides. Esteroides anabólicos sintéticos. Hipertrofia muscular. Treinamento resistido. Saponina esteroidal.

ABSTRACT: 5 α -hydroxy laxogenin (5 α -HL) is being inadvertently used to improve performance, although reports of its anabolic and/or androgenic actions in healthy humans or animal models are lacking. In this study 5 α -HL (group THL) was compared with Oxandrolone (OX, group TOX) or vehicle (mineral oil, group TCN), given orally for six weeks to male Wistar rats subjected to resistance training in vertical ladder. Regardless of the treatment, the training protocol improved performance, recorded as the maximal load. 5 α -HL and OX affected plasma lipids, increased muscle mass gain (THL) and fiber diameter (TOX) without changing body mass, glucose homeostasis or adiposity. 5 α -HL, unlike OX, did not cause atrophy of the reproductive organs. 5 α -HL had a better anabolic androgenic relation than OX in this model. However, its adverse effects and its neutral effect on performance do not support its safe use by healthy humans.

KEYWORDS: Brassinosteroids. Synthetic anabolic steroids. Muscle hypertrophy. Resistance training. Steroidal saponin.

INTRODUÇÃO

Há um intenso marketing estimulando o uso de produtos contendo laxogenina como substituto natural dos esteroides anabolizantes sintéticos (SAS) para força e hipertrofia muscular. No entanto, estes produtos são geralmente compostos por 5 α -hidroxi laxogenina (5 α -HL), estruturalmente semelhante à laxogenina, uma saponina esteroidal do tipo espirostano, que é um brassinosteróide (BR); estes são fitohormônios conhecidos pela similaridade com os esteróides animais, embora com ação diversa em nível celular¹. A laxogenina é encontrada principalmente em plantas da espécie *Smilax sieboldii*² e apresenta propriedades promotoras de crescimento e vigor³.

Não há relatos da existência de 5 α -HL na natureza sendo considerada um derivado sintético da diosgenina^{4,5}, uma saponina esteroidal proveniente principalmente de plantas *Dioscorea* (por exemplo, inhame). A diosgenina é precursora de diversos esteroides sintéticos amplamente produzidos pela indústria farmacêutica⁶ e com diversas propriedades farmacológicas, como hipolipemiante, hipoglicemiante, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa, androgênica, estrogênica e contraceptiva^{7,8}.

A mídia on-line menciona, sem evidências, que o 5 α -HL tem uma relação androgênica anabólica semelhante à oxandrolona (OX), um derivado sintético da testosterona para administração oral. OX tem vantagens sobre a testosterona porque é mais resistente ao metabolismo degradativo do fígado; o grupo alquila no carbono 17 α do núcleo esteróide (composto 17 α -alquilado) aumenta sua ação^{9,10} e apresenta maior relação anabólico:androgênico, cerca de 10:1^{9,11}. Além disso, é bem absorvida após administração oral e possui alta afinidade pelas proteínas plasmáticas¹². Seu efeito anabólico foi observado tanto em homens jovens¹³ quanto em homens e mulheres mais velhos¹⁴. Contudo, o uso de OX é aprovado apenas para o tratamento de distúrbios catabólicos e retardo do crescimento puberal⁹ e não como substância ergogênica¹⁵.

O fato da 5 α -HL possuir estrutura similar à laxogenina e uma relação anabólico androgênica comparável à OX, está motivando o uso deste componente por praticantes de atividade física com a finalidade de melhorar o desempenho, especialmente devido a seus supostos efeitos anabólicos, como o ganho de massa muscular⁵. No entanto, relatos confirmando estas alegações não foram encontrados na literatura.

A ampla divulgação e utilização de suplementos contendo 5 α -HL e a falta de evidências que atestem seus benefícios no desempenho físico, motivaram esta primeira investigação dos efeitos da 5 α -HL em ratos Wistar. O treinamento resistido intervalado de alta intensidade foi utilizado como estímulo anabólico. Este é o primeiro estudo comparando tais efeitos em modelo animal, o que é importante para delinear o perfil da 5 α -HL e seus possíveis efeitos anabólicos e outros efeitos sistêmicos. Os resultados são relevantes porque a utilização de substâncias sem testes científicos pode ter um impacto negativo significativo na saúde humana.

MÉTODOS

MATERIAIS

Os componentes 5 α -HL e OX (Figura 1), ambos da China, foram adquiridos dos distribuidores brasileiros PHD Innovation Expertise e Infinity Pharma, respectivamente. As análises e aprovações desses produtos foram atestados através de métodos físico-químicos pelos distribuidores. Óleo mineral

(Nujol[®], Mantecorp, Brazil) foi usado como veículo para a administração oral de 5 α -HL e OX. Utilizou-se D-glucose anidra (Synth, Brazil)[®] para o teste oral de tolerância à glicose e insulín regular Novolin[®] (Novo Nordisk, Brazil) para o teste intraperitoneal de tolerância à insulina. Kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica, Brazil) foram utilizados para análises bioquímicas de plasma, soro e fígado. Glicosímetro digital portátil Optium Xceed[®] e tiras teste MediSense[®] (ambos da Abbott, Brazil) foram utilizados para medições de glicemia. Para o treinamento resistido foi utilizada uma escada vertical (dimensões: 80^o de inclinação; 1,10 m de altura; 10 cm de largura; 2 cm entre degraus). A carga era um tubo plástico preso à cauda do animal e preenchido com pesos de chumbo de pesca.

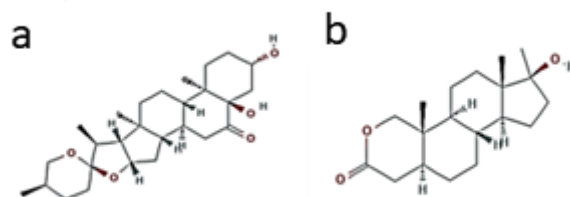


Figura 1. Estruturas moleculares de 5 α -hidroxi laxogenina (a) e oxandrolona (b).

ANIMAIS E MODELO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição (protocolo CEUA 8420230419). Todas as medidas foram tomadas para garantir o manejo e experimentação segura e confiável dos animais.

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com idade de 70 dias e peso de 340 ± 15 g no início do período experimental. Os animais foram acondicionados aos pares em caixas plásticas. Eles tiveram livre acesso a água e ração para roedores (Nuvilab[®], Nuvital, Brasil) e foram mantidos em sala com temperatura (23 ± 2 °C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) controlados.

Após três dias de adaptação ao novo ambiente, os animais foram habituados à escada vertical por três dias alternados, subindo-a três vezes sem carga. Na semana seguinte foram divididos aleatoriamente em três grupos de 8 a 10 animais cada. Os ratos foram submetidos a treinamento resistido e receberam óleo mineral (grupo TCN) ou OX (grupo TOX) ou 5 α -HL (grupo THL) por seis semanas consecutivas. 5 α -HL ou OX, ambos na dose de 20 mg/kg de massa corporal (MC) ou óleo mineral (veículo) foram administrados por via intragástrica (gavagem) num volume de 0,1 mL/100 g de MC uma vez ao dia, no período da tarde (por volta das 17h).

A dose de 20 mg/kg de MC de 5 α -HL foi baseada no estudo de Esposito et al.¹⁶, que avaliou o efeito de um BR nos perfis corporais e plasmáticos em ratos Wistar não treinados. Para fins comparativos, optou-se pela mesma dose de OX.

PROTOCOLO DE TREINAMENTO

A escada vertical utilizada para as sessões de treinamento possuía uma câmara na parte superior onde o rato poderia descansar. A base ficou distante 10 cm do chão para evitar contato com a carga que estava fixada na cauda do animal¹⁷⁻²¹.

O protocolo de treinamento foi adaptado de estudos anteriores com ratos¹⁹⁻²¹. Esse formato de treinamento proporciona volumes de treinamento adequados para respostas hipertróficas²². O treinamento foi realizado durante seis semanas, em três sessões semanais em dias alternados. A primeira sessão de cada semana foi um teste incremental para determinação da carga máxima (CM) individual. As outras duas sessões foram o treinamento propriamente dito a 90% da CM: essa carga caracterizou o protocolo como treinamento resistido de alta intensidade^{20,21}.

Na primeira semana a sessão de CM iniciou com 90% da massa corporal e nas semanas seguintes com 100% de CM da semana anterior. A cada subida completa houve um minuto de descanso e em seguida foram acrescentados 50 g, até que o rato não conseguisse mais alcançar a câmara superior.

Cada sessão de treinamento foi composta por três rodadas com tentativas contínuas de escalada cada uma, até a exaustão, e intervalo de um minuto entre as rodadas. A exaustão foi definida como a incapacidade do animal em finalizar uma tentativa de escalada mesmo após estímulos manuais não dolorosos na cauda.

REGISTRO DE DADOS

A massa corporal foi registrada todas as semanas. A ingestão de água e ração foi obtida uma vez por semana, mantendo os ratos em gaiolas individuais por 24 horas, e foi expressa por 100 g de MC. Ao final da intervenção, foi medido o comprimento naso-anal para cálculo do índice de massa corporal (IMC, em g/cm²).

Durante as sessões de CM, foram registrados a CM e o número de tentativas de escalada. As tentativas de escalada em cada rodada das duas sessões de treinamento também foram registradas.

TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL (GTT)

Após seis semanas de treinamento e gavagem, os ratos foram privados de alimentação por 12 horas (durante a noite) e receberam glicose por gavagem (1,5 g/kg de MC diluída em água). Amostras de sangue foram coletadas por punção na ponta da cauda aos 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos após a glicose oral, sendo o tempo zero imediatamente antes da gavagem e considerado como glicemia de jejum. A glicemia foi determinada através de tiras de teste e glicosímetro e expressa em mg/dL. A variação da glicemia de cada animal durante o teste de 60 min foi calculada como área incremental sob a curva (iAUC) utilizando a glicemia de jejum de cada animal como linha de base. Após as coletas, os animais foram recolocados em suas caixas originais e receberam ração e água.

TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (ITT)

Dois dias após o GTT, os animais foram privados de alimentação por 6 horas e receberam injeção intraperitoneal de insulina regular (1 U/kg de MC diluída em soro fisiológico). Amostras de sangue foram coletadas por punção na ponta da cauda nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 min, sendo o tempo zero min imediatamente antes da injeção de insulina. A glicemia foi determinada com tiras de teste e glicosímetro e expressa em mg/dL. O índice de queda da glicose no sangue (kITT, expresso em %/min) foi calculado durante os primeiros 30 min. No final do teste os ratos foram devolvidos às suas caixas originais e receberam ração e água.

COLETA DE TECIDOS E ÓRGÃOS

Dois dias após o ITT, os animais foram privados de alimentação por 12 horas e receberam injeção intraperitoneal de dose letal de anestésico (tiopental sódico 120 mg/kg MC após lidocaína 5 mg/kg MC). Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca; em seguida, foram retirados e pesados os tecidos e órgãos: fígado, coração, rins, testículos, vesículas seminais, próstata, tecido adiposo branco (TAB: retroperitoneal, epididimal, mesentérico e inguinal), tecido adiposo marrom e músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio). O índice de adiposidade foi a razão entre o TAB e a massa corporal. Os pesos dos tecidos foram expressos em relação à massa corporal (g/100 g de MC). Amostras de fígado, WAT e músculo esquelético foram armazenadas para análises posteriores.

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Kits comerciais foram utilizados para determinação sérica de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos (TG) e os resultados foram expressos em mg/dL. As lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente), também expressas em mg/dL, foram calculadas a partir de Friedewald²³. A relação CT/HDL foi utilizada como índice aterogênico.

Os níveis plasmáticos de frutamina (em mmol/L), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP, em U/L), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO, em U/L) e ureia (em mg/dL) também foram determinados com kits.

MORFOMETRIA DE FIBRAS MUSCULARES E ADIPÓCITOS

Amostras do músculo gastrocnêmio direito e do TAB retroperitoneal foram dissecadas, pesadas e fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. As amostras foram desidratadas em séries ascendentes de álcool (70% a 100%), clarificadas em xilol e montadas em parafina. Cortes histológicos transversais (terço medial do gastrocnêmio, 10 µm de espessura; TAB retroperitoneal, 5 µm de espessura) foram feitos em micrótomo automático Leica RM 2145[®] (Leica, Alemanha) e corados com hematoxilina-eosina (HE). As imagens dos cortes histológicos em campos aleatórios foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX 50[®] acoplado a uma câmera de alta resolução Olympus PBM 35 B[®] (ambas da Olympus, Japão) com objetiva de 20X.

A análise morfométrica foi feita utilizando o analisador de imagens Image-Pro Plus[®] (Media Cybernetics, EUA). Foi registrado o menor diâmetro de 200 fibras musculares por animal por grupo, conforme método descrito por Aguiar²⁴. O diâmetro dos adipócitos foi determinado em 10 campos por animal. Todos os adipócitos inteiramente vistos em cada campo foram medidos. Em ambas as análises os resultados foram expressos em µm.

CONTEÚDO LIPÍDICO DO FÍGADO

Amostras de fígado previamente armazenadas a -80 °C foram utilizadas para análise do conteúdo lipídico pelo método gravimétrico²⁵. Os lipídios foram extraídos das amostras de fígado (cerca de 1,0 g) em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v:v). Após suspensão lipídica em Triton 2%, agitação e aquecimento a 55 °C, os conteúdos de CT e TG foram determinados com kits comerciais e expressos em mg/dL. O conteúdo lipídico total foi expresso em g de gordura/100 g de fígado, enquanto CT e TG foram expressos em mg/g de lipídios totais.

ESTATÍSTICA

Os resultados dos três grupos são apresentados como média e erro padrão (média ± EP), salvo indicação em contrário; nas figuras os valores individuais também são mostrados. Os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados através de ANOVA unidirecional com post hoc de Tukey considerando o nível de significância de 5%. Os dados sequenciais dentro de um grupo foram comparados com ANOVA de medidas repetidas com post hoc de Dunnett. O software Prism 8.0 (GraphPad, EUA) foi utilizado para análises estatísticas e elaboração das figuras.

RESULTADOS

TREINAMENTO

A Tabela 1 apresenta as variáveis do protocolo de treinamento. O número de tentativas de escalada, CM relativa (g/100 g MC) e volume de treinamento não foram diferentes entre os grupos em cada semana registrada ($p > 0,05$).

Os grupos também foram analisados individualmente. Houve um aumento gradual da CM relativa da semana 1 à semana 6 em todos os grupos: cerca de 17 g/100 g para o grupo TCN, 14 para o grupo TOX e 11 para THL. Quanto ao número de tentativas de escalada, o grupo THL teve uma diminuição significativa na semana 6 quando comparado com a semana 1; os valores diminuídos dos grupos TCN e TOX não alcançaram significância ($p > 0,05$). Por fim, o grupo TCN teve aumento no volume de treinamento nas semanas 3 e 6 em comparação com a semana 1, enquanto os grupos TOX e THL não tiveram diferenças significativas neste parâmetro de treinamento ($p > 0,05$).

Tabela 1. Variáveis de treinamento dos ratos dos grupos TCN, TOX e THL.

Variáveis	TCN	TOX	THL
Carga máxima relativa			
Semana 1	12.03 ± 0.72 ^a	12.75 ± 1.25 ^a	11.71 ± 0.37 ^a
Semana 3	20.90 ± 2.24 ^{ab}	17.55 ± 1.58 ^a	21.69 ± 1.67 ^b
Semana 6	29.62 ± 4.24 ^b	26.39 ± 2.21 ^b	22.60 ± 1.75 ^b
Séries			
Semana 1	5.67 ± 1.07 ^a	5.89 ± 1.10 ^a	8.80 ± 1.21 ^a
Semana 3	6.11 ± 0.73 ^a	6.78 ± 0.97 ^a	6.10 ± 0.79 ^{ab}
Semana 6	3.67 ± 0.58 ^a	4.22 ± 0.46 ^a	3.50 ± 0.95 ^b
Volume de treino*			
Semana 1	66.41 ± 11.90 ^a	76.88 ± 15.30 ^a	104.90 ± 16.00 ^a
Semana 3	132.80 ± 27.41 ^b	124.03 ± 20.95 ^a	129.60 ± 18.22 ^a
Semana 6	116.00 ± 28.73 ^{ab}	113.40 ± 18.05 ^a	82.21 ± 23.29 ^a

Resultados expressos como média ± EP (n = 8/grupo). Para a comparação entre semanas dentro de cada grupo, diferentes letras sobrescritas representam diferença estatística ($p < 0,05$, medidas repetidas ANOVA/Dunnett).

*tentativas de escalada multiplicadas pela carga de treino da semana.

PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

A Figura 2a mostra o perfil da massa corporal durante as seis semanas de intervenções para os três grupos. A inserção demonstra que não houve diferença entre os grupos no ganho de massa corporal ($p>0,05$).

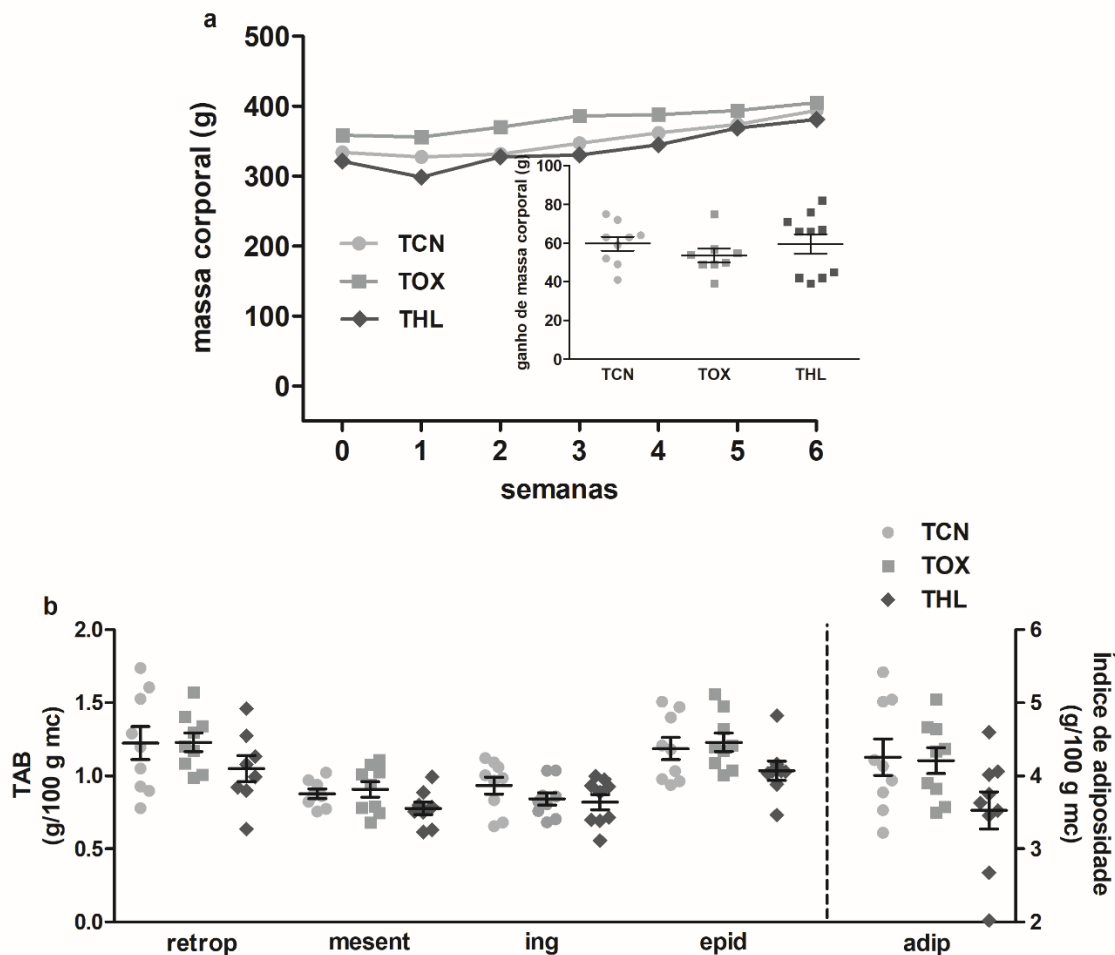


Figura 2. Massa corporal (a) durante as seis semanas de intervenção e tecido adiposo branco (b) dos ratos dos grupos TCN, TOX e THL. Resultados expressos como média e média \pm EP (detalhe) ($n = 8-10$ /grupo). Tecidos adiposos brancos retroperitoneais (retrop), mesentéricos (mesent), inguinais (ing), epididimais (epididimais) (TAB); índice de adiposidade (adip).

Na Tabela 2 estão os valores biométricos durante e ao final da intervenção. As ingestões diárias de ração e água, registradas uma vez por semana durante seis semanas, foram semelhantes entre os grupos, assim como o IMC e a massa dos rins, músculo sóleo e tecido adiposo marrom ($p>0,05$).

O grupo tratado com OX apresentou maior massa hepática e menor massa dos testículos, vesículas seminais e próstata em comparação com o grupo controle tratado com óleo mineral (TCN). Em contrapartida, essas alterações não foram observadas nos animais que receberam 5 α -HL, o que causou apenas maior massa do gastrocnêmio e menor massa do coração em relação aos demais grupos.

Os TAB viscerais (retroperitoneal, mesentérico e epididimal) e subcutâneo (inguinal) não foram diferentes entre os grupos (Figura 2b), nem o índice de adiposidade. Embora a administração de 5 α -HL tendesse a diminuir estes valores, as diferenças não foram significativas ($p>0,05$).

Tabela 2. Valores biométricos e parâmetros bioquímicos dos ratos dos grupos TCN, TOX e THL.

Variáveis	TCN	TOX	THL
Ingestão diária de alimento (g/100 g MC)	8.07 ± 0.14 ^a	7.91 ± 0.19 ^a	7.66 ± 0.18 ^a
Ingestão diária de água (mL/100 g MC)	13.75 ± 0.36 ^a	13.63 ± 0.30 ^a	13.36 ± 0.28 ^a
IMC (g/cm ²)	0.68 ± 0.01 ^a	0.68 ± 0.01 ^a	0.65 ± 0.01 ^a
Rins (g/100 g MC)	0.64 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.01 ^a
Testículos (g/100 g MC)	0.86 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.03 ^b	0.88 ± 0.02 ^a
Vesículas seminais (g/100 g MC)	0.45 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.02 ^b	0.43 ± 0.01 ^a
Próstata (g/100 g MC)	0.13 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^a
Músculo sóleo (g/100 g MC)	0.08 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.00 ^a	0.09 ± 0.00 ^a
Músculo gastrocnêmio (g/100 g MC)	1.04 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.02 ^a	1.13 ± 0.02 ^b
Coração (g/100 g MC)	0.39 ± 0.01 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.01 ^b
Fígado (g/100 g MC)	3.04 ± 0.06 ^a	3.31 ± 0.07 ^b	2.95 ± 0.06 ^a
Tecido adiposo marrom (g/100 g MC)	0.06 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^a
Bioquímica plasmática	TCN	TOX	THL
Glicose de jejum (mg/dL)	84.38 ± 2.91 ^a	90.88 ± 1.57 ^a	89.75 ± 1.88 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	55.62 ± 2.56 ^a	74.75 ± 4.78 ^b	40.56 ± 2.82 ^c
Colesterol total (mg/dL)	66.63 ± 2.69 ^a	70.75 ± 2.37 ^a	72.66 ± 3.50 ^a
HDL (mg/dL)	40.00 ± 2.48 ^{a, b}	45.38 ± 2.42 ^a	32.87 ± 2.58 ^b
LDL (mg/dL)	15.50 ± 2.55 ^a	11.85 ± 2.55 ^a	31.67 ± 2.26 ^b
VLDL (mg/dL)	11.12 ± 0.51 ^a	14.95 ± 0.95 ^b	8.11 ± 0.56 ^c
Índice aterogênico	1.69 ± 0.07 ^a	1.59 ± 0.10 ^a	2.26 ± 0.12 ^b
TGO (U/L)	82.62 ± 8.82 ^a	78.31 ± 2.49 ^a	80.44 ± 4.35 ^a
TGP (U/L)	34.50 ± 1.72 ^a	50.00 ± 1.08 ^b	41.56 ± 1.65 ^c
Frutosamina (mmol/L)	0.86 ± 0.05 ^a	0.95 ± 0.02 ^a	0.71 ± 0.01 ^b
Ureia (mg/dL)	38.81 ± 1.68 ^a	38.88 ± 1.41 ^a	39.56 ± 0.99 ^a

Resultados expressos como média ± EP (n = 8/grupo). Letras sobrescritas diferentes na mesma linha representam diferença estatística (p<0,05, ANOVA/Tukey unidirecional). MC: massa corporal; IMC: índice de massa corporal.

TESTES *IN VIVO*

Na Figura 3a é apresentado o perfil da glicemia durante os 60 minutos após a gavagem de glicose. A AUC mostrou que não houve diferença no teste de tolerância à glicose entre os grupos (Figura 3b).

Durante o ITT intraperitoneal (Figura 3c), os três grupos apresentaram decaimentos semelhantes de glicemia (kITT) durante os primeiros 30 minutos do teste (Figura 3d).

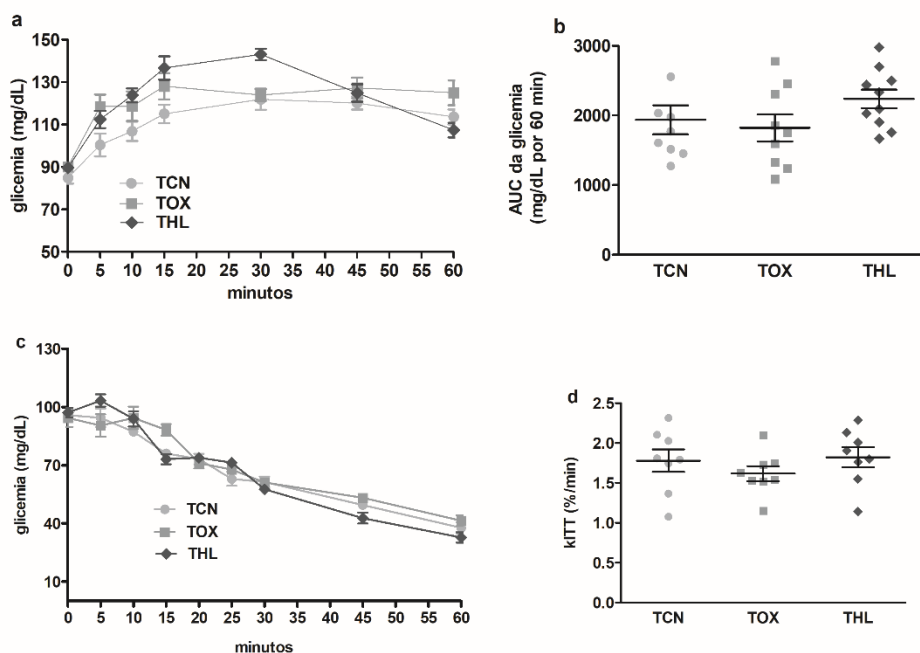


Figura 3. Perfis de GTT (a) e iAUCs (b); Perfis de ITT (c) e kITTs (d) de ratos dos grupos TCN, TOX e THL. Resultados expressos em média (a) e média \pm EP (b) (n = 8-10/grupo).

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Após a eutanásia, foi coletado sangue para análise bioquímica. A Tabela 2 apresenta a glicemia de jejum, perfil lipídico, ureia, marcadores de lesão hepática e de glicação proteica. Não houve diferenças entre os grupos para glicemia de jejum, colesterol total, TGO e ureia.

Os ratos tratados com OX apresentaram níveis mais elevados de TG e VLDL que o grupo controle (TCN), enquanto no grupo THL esses valores foram menores. Quanto ao HDL e LDL, o grupo tratado com OX foi semelhante ao grupo controle, mas a 5 α -HL aumentou o LDL em comparação com os outros dois grupos e diminuiu o HDL em comparação com o TOX, resultando em um índice aterogênico maior neste grupo do que nos outros.

Tanto a administração de OX quanto de 5 α -HL resultaram em níveis mais elevados de TGP em comparação com o controle, embora o efeito de 5 α -HL tenha sido menor que o de OX. A frutamina foi menor apenas nos animais tratados com 5 α -HL.

Não foram encontradas diferenças no conteúdo lipídico total (Figura 4a), colesterol total (Figura 4b) e triglicerídeos (Figura 4c) nas amostras de fígado dos animais dos três grupos.

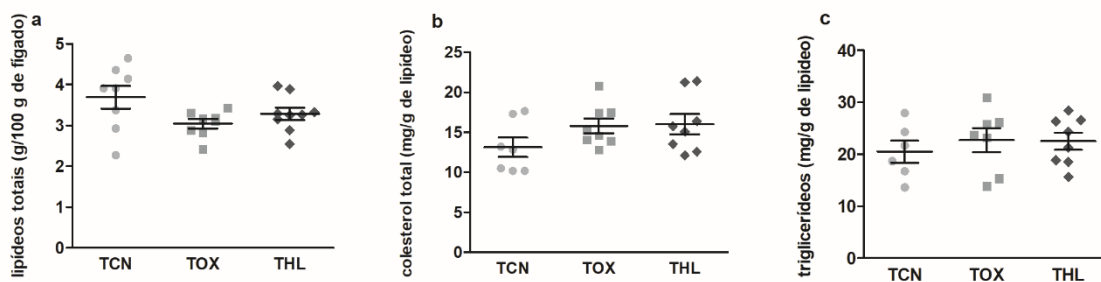


Figura 4. Conteúdo lipídico hepático dos ratos dos grupos TCN, TOX e THL. (a) Lipídios totais, (b) colesterol total e (c) triglicerídeos. Resultados expressos como média \pm EP (n = 8/grupo).

DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES E ADIPÓCITOS

A análise do músculo gastrocnêmio mostrou que o diâmetro da fibra foi maior com a administração de OX do que no grupo TCN, enquanto o 5 α -HL não produziu o mesmo resultado (Figura 5a).

Quando o tecido adiposo branco retroperitoneal foi analisado, não houve diferenças ($p > 0,05$) no diâmetro dos adipócitos entre os grupos (Figura 5b).

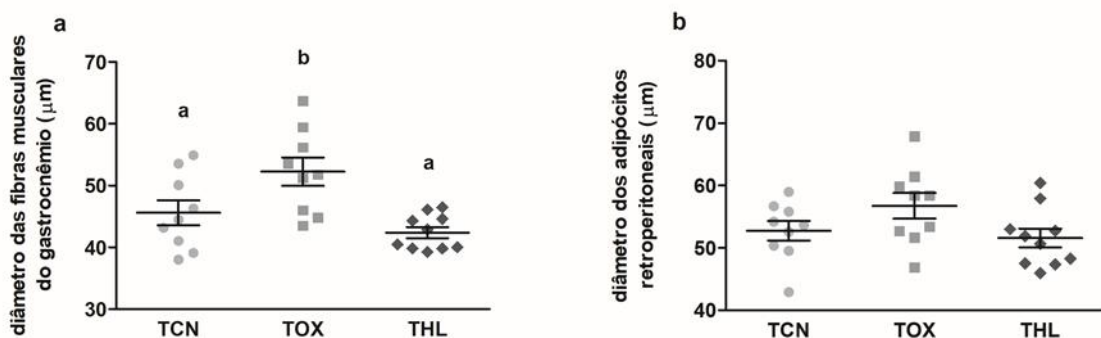


Figura 5. Diâmetro das fibras musculares (a) e dos adipócitos (b) dos ratos dos grupos TCN, TOX e THL. Resultados expressos como média \pm EP (n = 9-10/grupo). Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey unidirecional).

DISCUSSÃO

Análises experimentais cuidadosas em modelos animais são um passo inicial, mas essencial para o uso seguro de qualquer substância química, seja ela natural ou sintética, incluindo fitormônios com suposta ação anabólica. O uso inadequado dessas substâncias pode trazer sérios riscos à saúde humana, pois podem ter biodisponibilidade, estruturas químicas e atividades biológicas desconhecidas. A sua atratividade reside no fato de prometerem menos efeitos colaterais em comparação com os esteróides sintéticos já amplamente – e por vezes perigosamente – utilizados.

Este estudo propôs a primeira avaliação experimental dos efeitos da 5 α -HL em ratos Wistar submetidos a um protocolo de treinamento resistido. A ampla utilização dessa substância para melhoria do desempenho físico se deve à sua homologia com a laxogenina, fitoesteróide que atua no crescimento das plantas através de receptores de membrana celular²⁶. Os resultados mostraram que o 5 α -HL apresentou melhor relação androgênica anabólica quando comparado ao esteroide anabolizante

sintético OX, pois o 5 α -HL não causou atrofia dos órgãos reprodutivos. Porém, ambos promoveram dislipidemia, aumentaram marcadores de risco cardiovascular e de dano hepático, e não melhoraram o desempenho no treinamento resistido. Embora preliminares, estes resultados levantam um alerta contra o uso indiscriminado de 5 α -HL para melhoria de desempenho pela população em geral.

O protocolo de treinamento desta investigação, embora utilize força em vez de resistência, foi concebido como treinamento intervalado de alta intensidade, que se caracteriza por sessões de treinos de alta intensidade intercalados com períodos de menor intensidade ou descanso²⁷. A eficácia foi demonstrada pelo aumento progressivo da CM – e portanto da força – dos três grupos durante o período de treinamento de seis semanas, de acordo com estudos em camundongos^{20,21}, ratos²⁸ e humanos jovens²⁹. O volume de treinamento não se alterou em nenhum dos grupos, o que pode ser explicado pela diminuição das tentativas de subida em cada sessão à medida que a CM aumentava, principalmente nas últimas semanas. No entanto, não houve diferença em CM, repetições totais de escalada ou volume de treinamento entre os grupos, demonstrando que a melhora no desempenho se deveu apenas ao protocolo de treinamento de resistência, e não à própria OX ou 5 α -HL. Ratos que receberam SAS injetável também não alteraram sua carga máxima quando submetidos ao treinamento resistido³⁰.

Embora os tratamentos não tenham melhorado o desempenho no exercício, houve um pequeno, mas significativo aumento da massa gastrocnêmia promovida pelo 5 α -HL e do diâmetro da fibra gastrocnêmia promovido pelo OX. Esses resultados sugerem diferentes mecanismos de ação desses produtos na hipertrofia muscular, que podem ser tanto intracelulares, como aumento de miofibrilas e componentes sarcoplasmáticos, quanto extracelulares, como aumento de elementos da matriz³¹. Estudos de fibras musculares esqueléticas cultivadas de ratos mostram que os BRs são eficazes na modulação da síntese protéica através da ativação da fosforilação da Akt. Akt é uma quinase que atua em diversas vias de sinalização intracelular, incluindo aquelas envolvidas na síntese protéica via mTOR (uma proteína quinase) e aquelas que inibem a proteólise e a apoptose do músculo esquelético via fosforilação de fatores de transcrição da família FoxO³². Além disso, a Akt estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio³³. Especificamente, um estudo mostrou a ação do OX através dos receptores androgênicos intracelulares e subsequentes efeitos genômicos; isso melhora a eficiência muscular na síntese de proteínas, aumentando o influxo e a utilização de aminoácidos, além de aumentar a expressão de receptores androgênicos¹². Alterações na matriz extracelular devido à atividade física, como remodelamento do colágeno, foram descritas³⁴, mas investigações correspondentes utilizando 5 α -HL, OX ou mesmo BRs não foram encontradas.

Independentemente da administração de 5 α -HL, OX ou veículo, os grupos não diferiram no ganho de massa corporal, IMC, índice de adiposidade ou tamanho dos adipócitos retroperitoneais. Esses resultados podem ser parcialmente explicados pela ingestão semelhante de ração dos grupos. Em ratos Wistar submetidos ao HIIT de resistência e suplementados com proteína²⁸ e em ratos tratados com BR e treinados alimentados com ração normal ou enriquecida com proteína¹⁶, esses parâmetros também não foram alterados, sugerindo que a falta de diferença nos resultados aqui apresentados não foi causada por déficit proteico ou por tipo/dose das substâncias testadas. Apesar do uso indiscriminado do OX na busca pela maximização do exercício físico e do desempenho esportivo, os dados da literatura sobre esses aspectos são escassos, pois o OX não é recomendado para esse fim. Sua segurança e aplicabilidade são mais conhecidas no tratamento de distúrbios catabólicos³⁵.

Os efeitos androgênicos de 5 α -HL e OX foram avaliados pela massa relativa dos órgãos reprodutivos (testículos, vesículas seminais e próstata), que apresentaram diminuição acentuada quando os animais foram tratados com OX, mas não com 5 α -HL. Um estado hipogonadotrófico, caracterizado por atrofia testicular, baixos níveis de testosterona endógena e espermatogênese

reduzida, decorre dos efeitos supressores da SAS exógena no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e diretamente nos testículos^{35,36}. Baixos níveis de testosterona plasmática podem estar relacionados com diminuição da força e massa muscular³⁷, o que poderia explicar parcialmente a falta de resposta mais eficaz de hipertrofia muscular e volume de treinamento ao OX neste estudo. O efeito androgênico dos BRs foi avaliado em um único estudo em ratos castrados; não houve diferença na massa relativa dos órgãos reprodutivos³⁴, reforçando a falta de efeito androgênico do 5 α -HL, provavelmente devido ao diferente mecanismo de ação em relação ao OX.

O treinamento resistido não teve impacto na homeostase da glicose, pois o perfil glicêmico não foi afetado pelos desafios de glicose (GTT) ou insulina (ITT) em nenhum dos grupos. Observação semelhante foi feita em ratos treinados sob suplementação proteica²⁸. Há escassez de estudos avaliando a homeostase da glicose sob administração de OX e BRs, mas são unânimes na ausência de efeito em ratos e humanos^{16,38-42}. Um efeito hipoglicêmico dos BRs foi relatado em camundongos obesos e foi relacionado ao aumento da sensibilidade à insulina e à inibição de enzimas gliconeogênicas⁴³. Curiosamente, o 5 α -HL diminuiu a frutossamina, que representa a glicosilação de proteínas e é amplamente utilizada no diagnóstico e monitoramento da glicemia⁴⁴; isto sugere um possível efeito benéfico do 5 α -HL em condições de hiperglicemia persistente.

Um aspecto aparente tanto com OX quanto com 5 α -HL foi a dislipidemia, embora com apresentações distintas. Os animais tratados com OX apresentaram níveis mais elevados de TG e VLDL, sugerindo maior risco cardiovascular⁴⁵, enquanto os ratos tratados com 5 α -HL apresentaram baixos TG, VLDL e HDL, mas elevados LDL e índice aterogênico. Os níveis de TG não foram afetados quando ratos não treinados receberam BR na mesma dose aqui utilizada¹⁶. Porém, quando atletas utilizam doses supra-fisiológicas de SAS, os níveis lipídicos variam de acordo com o tipo, combinação e duração do uso^{46,47}.

Embora a literatura enfatize o efeito aterogênico do SAS – especialmente os compostos 17 α -alquilados de uso oral – resultante do aumento do LDL e da diminuição do HDL no plasma⁴⁸, esse efeito foi observado apenas com a administração de 5 α -HL, revelando um efeito adverso deste produto. O índice aterogênico⁴⁹, assim como uma relação LDL/HDL⁵⁰ mais elevada, está associado a maior risco de doenças cardiovasculares. Investigações são necessárias para abordar o impacto dessas substâncias na função cardiovascular.

A toxicidade hepática foi monitorada através de marcadores de dano hepático, TGO e TGP. Em qualquer espécie, incluindo humanos, a atividade da TGP é maior no fígado, enquanto a TGO é maior no músculo esquelético e cardíaco⁵¹. Os animais que receberam 5 α -HL e especialmente OX apresentaram níveis de TGP superiores aos controles. Kobayashi e colaboradores⁵² relataram a relação entre altos níveis plasmáticos de transaminases e medicamentos modificadores do metabolismo de lipídios e/ou glicose; aqui, tanto o 5 α -HL quanto o OX alteraram os níveis plasmáticos lipídicos e aumentaram o TGP plasmático. Avaliações da função hepática sob administração de BRs não foram encontradas, enquanto degeneração lipídica no fígado de ratos⁵³ e alterações nos níveis de transaminases^{50,54,55} foram observadas com o uso de compostos 17 α -alquilados. Um aumento acentuado de TGP foi observado em homens mais velhos treinados em uso de OX⁵⁶. Estudos apontam que as alterações plasmáticas das transaminases são geralmente transitórias e retornam aos valores basais quando o uso do SAS é interrompido^{9,57}.

Ao contrário do 5 α -HL, o OX aumentou a massa relativa do fígado, estando de acordo com estudos que apontam alterações histológicas, como adenomas e hiperplasia hepatocelular⁵⁷, associadas ao uso de SAS 17 α -alquilado, bem como à indução de proliferação celular em fígado de rato⁵³. Análises histológicas são necessárias para confirmar as possíveis alterações morfológicas no fígado, pois existe

uma relação entre níveis plasmáticos elevados de transaminases e aumento do fígado devido ao dano aos hepatócitos pelos medicamentos⁵⁸.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou, tanto quanto pôde ser verificado, pela primeira vez em ratos saudáveis, que 5 α -HL tem uma melhor relação androgênica anabólica, mas é semelhante à OX na promoção de dislipidemia, sinais de hepatotoxicidade e risco de doença cardiovascular em ratos submetidos a treinamento resistido. Juntamente com a falta de efeito do 5 α -HL no desempenho do exercício, estes resultados não apoiam nem um efeito anabólico nem uma utilização segura por seres humanos saudáveis. Mais investigações são necessárias para avaliar os efeitos e riscos do 5 α -HL para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

1. Bishop GJ, Koncz C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell*. 2002;14(Suppl 1):97-110. <https://doi.org/10.1105/tpc.001461>
2. Okanishi T, Akahori A, Yasuda F. Studies on the steroidal components of domestic plants. XLVII. Constituents of the stem of *Smilax Sieboldii* Miq. (1). The structure of laxogenin. *Chem Pharm Bull*. 1965;13(5):545-50. <https://doi.org/10.1248/cpb.13.54>
3. Iglesias-Arteaga MA, Gil RP, Martínez CSP, Machado RC. Spirostanic analogues of testosterone. Synthesis, characterization and biological activity of laxogenin, 23-hydroxylaxogenin and 23-ketolaxogenin (23-oxolaxogenin). *J Chem Soc*. 2001;1:261-6. <https://doi.org/10.1002/chin.200435179>
4. Rodríguez CR, Vilalobos YI, Becerra EA, Machado FC, Herrera DC, Zullo MAT. Synthesis and biological activity of three new 5 α -hydroxy spirostanic brassinosteroid analogues. *J Braz Chem Soc*. 2003;14(3):466-9. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000300022>
5. Avula B, Chittiboyina AG, Bae JY, Hider S, Wang YH, Wang M, et al. The power of hyphenated chromatography - Time of flight mass spectrometry for unequivocal identification of spirostanes in bodybuilding dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;67:74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.045>
6. Cheng ZH, Wu T, Yu BY. Steroidal glycosides from tubers of *Ophiopogon japonicus*. *J Asian Nat Prod Res*. 2006;8(6):555-9. <https://doi.org/10.1080/10286020410001721122>
7. Salehi B, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad J, Naz R, Yousaf Z, et al. Dioscorea plants: a genus rich in vital nutra-pharmaceuticals - A review. *Iran J Pharm Res*. 2019;18(Suppl 1):68-89. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.112501.1379>
8. Parama D, Boruah M, Kumaril Y, Rana V, Banik K, Harsha C, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogues: effective therapies against different chronic diseases. *Life Sci*. 2020;260:118182. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118182>
9. Orr R, Singh MF. The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders. *Drugs*. 2004;64(7):725-50. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464070-00004>
10. Wu C, Kovac JR. Novel uses for the anabolic androgenic steroids nandrolone and oxandrolone in the management of male health. *Curr Urol Rep*. 2016;17(10):72. <https://doi.org/10.1007/s11934-016-0629-8>
11. Kuhn CM. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:411-34. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.411>
12. Miller JT, Btaiche IF. Oxandrolone treatment in adults with severe thermal injury. *Pharmacotherapy*. 2009;29(2):213-26. <https://doi.org/10.1592/phco.29.2.21>

13. Sheffield-Moore M, Urban RJ, Wolf SE, Jian J, Catlin DH, Herndon DN, et al. Short-term oxandrolone administration stimulates net muscle protein synthesis in young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2705-11. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.8.5923>
14. Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Casperson SL, Gilkison C, Volpi E, Wolf SE, et al. Androgen therapy induces muscle protein anabolism in older women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):3844-9. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0588>
15. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, McGee SL, et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol.* 2008;586(1):151-60. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142109>
16. Esposito D, Rathinasabapathy T, Poulev A, Komarnytsky S, Raskin I. Akt-dependent anabolic activity of natural and synthetic brassinosteroids in rat skeletal muscle cells. *J Med Chem.* 2011a;54(12):4057-66. <https://doi.org/10.1021/jm200028>
17. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998;77(4):372-8. <https://doi.org/10.1007/s00421005034>
18. Hornberger Jr TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004;29(1):16-31. <https://doi.org/10.1139/h04-00>
19. Pereira VAR, Vedovelli KS, Muller GY, Depieri YF, Avelar DHCG, de Amo AHE, et al. Pros and cons of insulin administration on liver glucose metabolism in strength-trained healthy mice. *Braz J Med Biol Res.* 2019;52(2):e7637. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187637>
20. Muller GY, Amo AHE, Vedovelli KS, Mariano IR, Bueno GC, Furlan JP, et al. Resistance high-intensity interval training (HIIT) improves acute gluconeogenesis from lactate in mice. *Am J Sports Sci.* 2019;7(2):53-9. <https://doi.org/10.11648/j.ajss.20190702.12>
21. Muller GY, Matos FO, Perego-Junior JE, Kurauti MA, Pedrosa MMD. High-intensity interval resistance training (HIIRT) improves liver gluconeogenesis from lactate in Swiss mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2022;47(4):439-46. <https://doi.org/10.1139/apnm-2021-0721>
22. Radaelli R, Fleck SJ, Leite T, Leite RD, Pinto RS, Fernandes L, et al. Dose-response of 1, 3, and 5 sets of resistance exercise on strength, local muscular endurance, and hypertrophy. *J Strength Cond Res.* 2015;29(5):1349-58. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000075>
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
24. Aguiar AF, Aguiar DH, Felisberto ADS, Carani FR, Milanezi RC, Padovani CR, et al. Effects of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain (MHC) expression in rat skeletal muscle fibers. *J Strength Cond Res.* 2010;24(1):88-96. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181aeb103>
25. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
26. Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature.* 2001;410(6826):380-3. <https://doi.org/10.1038/35066597>
27. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol.* 2012;590(5):1077-84. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.22472>
28. Lima YC, Kurauti MA, Alves GF, Ferezini J, Piovon S, Malta A, et al. Whey protein sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni (Bert.) increases mitochondrial biogenesis markers in the skeletal muscle of resistance-trained rats. *Nutr Metab.* 2019;16:65. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0391-2>
29. Schoenfeld BJ, Grgic J, Ogborn D, Krieger JW. Strength and hypertrophy adaptations between low- vs. high-load resistance training: a systematic review and meta-analysis. *J Strength Condit Res.* 2017;31(12):3508-23. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000220>

30. Arazi H, Rahmati S, Ghafoori H. The interaction effects of resistance training and sustanon abuse on liver antioxidant activities and serum enzymes in male rats. *Interv Med Appl Sci.* 2017;9(3):178-83. <https://doi.org/10.1556/1646.9.2017.2>
31. Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B. Molecular mechanisms of skeletal muscle hypertrophy. *J Neuromusc Dis.* 2012;8(2):169-83. <https://doi.org/10.3233/JND-200568>
32. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
33. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1009-13. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-100>
34. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004;84(2):649-98. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.200>
35. Grottke BH, Ahmad N, Warren DW. The effects of an anabolic steroid (oxandrolone) on reproductive development in the male rat. *Acta Endocrinol.* 1992;126(2):173-8. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1260173>
36. Souza GL, Hallak J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU Intern.* 2011;108(11):1860-5. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10131.x>
37. Tan RS, Scally MC. Anabolic steroid-induced hypogonadism – towards a unified hypothesis and anabolic steroid action. *Med Hypotheses.* 2009;72(6):723-8. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.12.042>
38. Schroeder ET, Zheng L, Ong MD, Martinez C, Flores C, Stewart Y, et al. Effects of androgen therapy on adipose tissue and metabolism in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):4863-72. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0784>
39. Demling R. The use of anabolic agents in catabolic states. *J Burns Wounds.* 2007;6:e2.
40. Venâncio DP, Nobrega ACL, Tufik S, Melo MT. Descriptive assessment on the use of anabolic steroids and their effect on the biochemical and neuroendocrine variables in practitioners of resisted exercise. *Rev Bras Med Esporte.* 2010;16(3):191-5. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922010000300007>
41. Esposito D, Rathinasabapathy T, Poulev A, Komarnytsky S, Raskin I. Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB J.* 2011b;25(10):3708-19. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181271>
42. Schwingel PA, Cotrim HP, Salles BR, Almeida CE, Santos CRJ, Nacheff B, et al. Anabolic-androgenic steroids: a possible new risk factor of toxicant-associated fatty liver disease. *Liver Intern.* 2011;31(3):348-53. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02346.x>
43. Esposito D, Kizelsztejn P, Komarnytsky S, Raskin I. Hypoglycemic effects of brassinosteroid in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(5):E652-8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00024.2012>
44. Ribeiro RT, Macedo MP, Raposo JF. HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycemic conditions. *Curr Diab Ver.* 2016;12(1):14-19. <https://doi.org/10.2174/1573399811666150701143112>
45. Vallejo-Vaz AJ, Corral P, Schreier L, Ray KK. Triglycerides and residual risk. *Curr Opin Endocrinol Diab Obes.* 2020;27(2):95-103. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000530>
46. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004;34(8):513-54. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434080-0000>
47. Morikawa AT, Maranhão RC, Alves MJ, Negrão CE, da Silva JL, Vinagre CG. Effects of anabolic androgenic steroids on chylomicron metabolism. *Steroids.* 2012;77(13):1321-6. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.08.004>
48. Liu JD, Wu YQ. Anabolic-androgenic steroids and cardiovascular risk. *Chin Med J.* 2019;132(18):2229-36. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000407>
49. Severo CB, Ribeiro JP, Umpierre D, Da Silveira AD, Padilha MC, De Aquino Neto FR, et al. Increased atherothrombotic markers and endothelial dysfunction in steroid users. *Eur J Prev Cardiol.* 2013;20(2):195-201. <https://doi.org/10.1177/2047487312437062>

50. Kunutsor SK, Zaccardi F, Karppi J, Kurl S, Laukkanen JA. Is high serum LDL/HDL cholesterol ratio an emerging risk factor for sudden cardiac death? Findings from the KIID study. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(6):600-8. <https://doi.org/10.5551/jat.37184>
51. Hall P, Cash J. What is the real function of the liver 'function' tests? *The Ulster Med J.* 2012;81(1):30-6.
52. Kobayashi A, Suzuki Y, Sugai S. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2020;45(9):515-37. <https://doi.org/10.2131/jts.45.51>
53. Boada LD, Zumbado M, Torres S, López A, Díaz-Chico BN, Cabrera JJ, et al. Evaluation of acute and chronic hepatotoxic effects exerted by anabolic-androgenic steroid stanozolol in adult male rats. *Arch Toxicol.* 1999;73(8-9):465-72. <https://doi.org/10.1007/s00204005063>
54. Dickerman RD, Pertusi M, Zachariah NY, Dufour DR, McConathy WJ. Anabolic steroid-induced hepatotoxicity: is it overstated? *Clin J Sports Med.* 1999;9(1):34-9. <https://doi.org/10.1097/00042752-199901000-0000>
55. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses.* 2016;93:150-3. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.06.004>
56. Mavros Y, O'Neill E, Connerty M, Bean JF, Broe K, Kiel DP, et al. Oxandrolone augmentation of resistance training in older women: a randomized trial. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(11):2257-67. <https://doi.org/10.1249/MSS.000000000000069>
57. Cabb E, Baltar S, Powers DW, Mohan K, Martinez A, Pitts E. The diagnosis and manifestations of liver injury secondary to off-label androgenic anabolic steroid use. *Case Rep Gastroenterol.* 2016;10(2):499-505. <https://doi.org/10.1159/00044888>
58. Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(6):614-20. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.05.006>