



Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico

José Carlos Silva Camargo Filho¹, Luiz Carlos Marques Vanderlei¹, Regina Celi Trindade Camargo¹, Fabiana Acorse Francischetti¹, Willian Dias Belangero² e Vitalino Dal Pai¹

RESUMO

Este estudo teve por objetivo analisar as alterações histológicas, histoquímicas e morfométricas das fibras do músculo sóleo de ratos submetidos a um programa de natação, associado ou não à administração do esteróide anabólico decanoato de nandrolona. Foram utilizados 22 ratos Wistar machos, 12 dos quais receberam injeção intramuscular do esteróide (5mg/kg) e 10, óleo mineral (5mg/kg), duas vezes por semana. Os animais foram submetidos a 42 sessões de natação por nove semanas (de segunda a sexta-feira), com aumento progressivo de carga por meio do tempo de natação. Após o sacrifício, o músculo sóleo esquerdo foi retirado, imerso em n-hexana e acondicionado em nitrogênio líquido. Cortes do terço médio desse músculo foram feitos em micrótomo criostato (-20°C) e corados pela técnica HE e pelo método histoquímico NADH-TR. Os animais submetidos a treinamento físico e a esteróide (TA) ou óleo mineral (TO) apresentaram fibras musculares com maior diâmetro, quando comparados com os animais-controle (NTA e NTO). Não houve diferença significativa entre as medidas das médias dos diâmetros das fibras dos grupos NTA e NTO e entre TA e TO. Nos grupos TA e NTA notou-se acentuado processo de fagocitose, arredondamento e hialinização das fibras musculares. Já nos grupos TA, TO e NTA observou-se perda da atividade enzimática oxidativa. Os resultados sugerem que a natação produz hipertrofia muscular de forma semelhante, tanto no grupo que recebeu esteróide como no que recebeu óleo mineral. No entanto, o grupo que recebeu esteróide apresentou sinais claros de maior degeneração muscular.

ABSTRACT

Effects of the anabolic steroid nandrolone on the soleum muscle of rats submitted to physical training through swimming: histological, histochemical and morphometrical study

The objective of this study was to analyze the histological, histochemical and morphometrical alterations of the fibers from the soleum muscle of rats submitted to a swimming program, associated or not to the administration of the anabolic steroid decanoate of nandrolone. 22 male Wistar rats were used, 12 of which received a muscle injection of steroid (5 mg/kg) and 10 received mineral oil (5 mg/kg), twice a week. The animals were submitted to 42 sessions of swimming during nine weeks (from Monday to Friday), with gradual load increase through the swimming time. After sacrifice, the

1. Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP – Presidente Prudente, SP, Departamento de Fisioterapia.
2. Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UNICAMP – Campinas, SP, Departamento de Traumatologia e Ortopedia.

Recebido em 9/9/05. Versão final recebida em 2/2/06. Aceito em 15/5/06.

Endereço para correspondência: José Carlos Silva Camargo Filho, Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, Câmpus de Presidente Prudente – Departamento de Fisioterapia, Rua Roberto Simonsen, 305, Cidade Universitária – 19060-900 – Presidente Prudente, SP. Caixa Postal: 957. Tel.: (18) 229-5388 – ramal 5365. E-mail: camargo@prudente.unesp.br

Palavras-chave: Histologia. Hipertrofia. Lesão.

Keywords: Histology. Hypertrophy. Injury.

Palabras-clave: Histología. Hipertrofia. Lesión.

left soleum muscle was removed, immersed in n-hexane and conditioned in liquid nitrogen. Third middle cuts of this muscle were made in microtome cryostat (-20°C), and stained through HE technique and through NADH-TR histochemic method. The animals submitted to physical training and steroid (TA) or mineral oil (TO) presented muscle fibers with bigger diameter when compared to the ones from the control group (NTA and NTO). There was not significant difference between NTA and NTO and between TA and TO groups fiber diameters measures. In the TA and NTA groups, severe process of phagocytes, rounding and hyalinization of muscle fibers was observed. On the other hand, in the TA, TO and NTA groups, loss of the oxidative enzymatic activity was seen. The results suggest that swimming produces muscle hypertrophy similarly, not only in the group that received steroid, but also in the one that received mineral oil. However, the group that received steroid presented clear signs of greater muscle degeneration.

RESUMEN

Efectos del esteróide anabólico nandrolona sobre el músculo soleo de ratones sometidos a entrenamiento físico a través de natación: estudio histológico, histoquímico y morfométrico

Este estudio ha tenido como objetivo analizar las alteraciones histológicas, histoquímicas y morfométricas de las fibras del músculo soleo de ratones sometidos a un programa de natación, asociado o no a la administración del esteróide anabólico decanoato de nandrolona. Fueron utilizados 22 ratones Wistar machos, 12 de los cuales recibieron inyección intramuscular del esteróide (5 mg/kg) y 10 recibieron aceite mineral (5 mg/kg), dos veces por semana. Los animales fueron sometidos a 42 sesiones de natación durante nueve semanas (de lunes a viernes), con aumento progresivo de carga mediante el tiempo de natación. Después del sacrificio, el músculo soleo izquierdo fue retirado, colocado en n-hexana y acondicionado en nitrógeno líquido. Se hicieron cortes del tercio medio de ese músculo en micrótomo criostato (-20°C) y pigmentados por la técnica HE y por el método histoquímico NADH-TR. Los animales sometidos a entrenamiento físico y al esteróide (TA) o aceite mineral (TO) presentaron fibras musculares con mayor diámetro, cuando comparados con los animales control (NTA y NTO). No hubo diferencia significativa entre las medidas de los promedios de los diámetros de las fibras de los grupos NTA y NTO y entre TA y TO. En los Grupos TA y NTA se notó acentuado proceso de fagocitosis, redondeo y hialinización de las fibras musculares. Sin embargo, en los grupos TA, TO y NTA se observó pérdida de la actividad enzimática de oxidación. Los resultados sugieren que la natación produce hipertrofia muscular de forma semejante, tanto en el grupo que recibió esteróide como en el que recibió aceite mineral. A pesar de eso, el grupo que recibió esteróide presentó claras señales de mayor degeneración muscular.

INTRODUÇÃO

Os esteróides anabólicos são substâncias sintéticas derivadas da testosterona que vêm despertando a atenção dos pesquisadores e de profissionais da área da saúde, devido a sua utilização irregular e em altas doses por atletas, estimada entre 10 e 100 vezes maior que a terapêutica⁽¹⁾, com o objetivo de melhorar o desempenho físico e aumentar a massa muscular⁽²⁻⁴⁾.

Essas substâncias aumentam a síntese de proteínas e o crescimento celular com pouco efeito androgênico⁽⁵⁾. No entanto, o seu uso tem sido associado a efeitos colaterais indesejáveis no fígado, sistema cardiovascular, sistema reprodutivo e no estado psicológico do usuário⁽⁶⁻⁹⁾.

Quando utilizadas durante o treinamento físico, no aparelho locomotor, essas substâncias produzem aumento tanto da massa como da força muscular, além de reduzir o tempo de recuperação após o treinamento físico⁽⁵⁾, características desejáveis para atletas de alto desempenho. A eficácia do ganho de força e do aumento da massa muscular promovida pelo uso de esteróides ainda é bastante controversa. Em animais, a combinação de esteróides anabolizantes e treinamento físico intenso não produziu aumento significativo na massa muscular quando comparado com animais submetidos somente a treinamento físico⁽¹⁰⁾. Por outro lado, outros estudos relataram não só aumento da força muscular como também alto consumo de proteínas e calorias⁽¹¹⁾, havendo inclusive a suspeita de que os esteróides anabólicos produzem hipertrofia mesmo em músculos imobilizados⁽¹²⁾.

Um dos modelos experimentais que pode ser utilizado para mimetizar os efeitos do treinamento físico sobre o sistema músculo-esquelético em animais de laboratório é a natação, um modelo experimental que, além da atividade física propriamente dita, produz também forte estímulo emocional que está relacionado ao tipo de atividade não habitual, à impossibilidade de fuga e à eminência de morte^(13,14). Na natação, a carga imposta ao aparelho locomotor se faz em função da viscosidade do meio, que produz resistência ao movimento, e das propriedades de flutuação do animal⁽¹⁵⁾. Além disso, outros fatores adicionais podem influenciar as respostas ao exercício na água, como a pressão hidrostática e o calor específico da mesma^(16,17).

Considerando-se essas premissas, o objetivo do estudo foi verificar as alterações histológicas, histoquímicas e morfométricas produzidas nas fibras musculares do músculo sóleo em dois grupos de ratos (sedentários e não sedentários), associadas ou não ao uso de esteróide anabólico.

MÉTODOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados 22 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade entre 100 e 180 dias, mantidos em gaiolas plásticas (30 x 16 x 19cm) coletivas com, no máximo, cinco animais. Antes de ser utilizados, esses animais permaneceram no biotério por uma semana para adaptação, com temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 7:00h. Os animais foram alimentados com ração padrão (Ração Probiotério – Marca *Primus*) e água de torneira fornecida à vontade. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia (Processo nº 035/2005) da Universidade Estadual Paulista – FCT/UNESP.

Os animais foram divididos em quatro grupos: dois sem atividade física (denominados sedentários) e dois submetidos à natação (denominados treinados). Dois grupos (sedentários e treinados) receberam duas vezes por semana injeção intramuscular de óleo mineral (5mg/kg – *Nujol* – Schering-Plough), enquanto que outros dois (sedentários e treinados) receberam 5mg/kg de decanoato de nandrolona (*Deca-Durabolir*® – Organon) duas vezes/semana⁽¹⁸⁾.

Os animais dos grupos treinados foram submetidos a 42 sessões de natação por nove semanas (de segunda a sexta-feira) em

um tanque medindo 100cm x 50cm x 60cm e profundidade de 40cm, contendo água a 30°C em quantidade suficiente para evitar que os animais apoiassem a extremidade da cauda no fundo do tanque.

O programa de treinamento consistiu de sessões diárias de natação, cinco dias por semana^(13,19), entre 8:00 e 11:00h, com sobrecarga produzida pelo aumento do tempo de treinamento. Na primeira semana os animais nadaram 10, 20, 30, 40 e 50 minutos por dia. Na segunda semana nadaram 50 minutos (segunda e terça) e 60 minutos (quarta a sexta-feira). Na terceira esse tempo foi de 60 (segunda e terça) e 70 minutos (quarta a sexta). Esse tempo foi mantido até a sexta semana, quando então se passou para 90 minutos/dia (quarta a sexta), permaneceu assim na sétima semana e na oitava semana aumentou para 120 minutos (quinta e sexta), mantendo-se assim na nona semana.

Imediatamente após o sacrifício por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico⁽²⁰⁾, foi retirado um fragmento central de 2,0cm por 0,8cm do músculo sóleo do membro pélvico esquerdo, tomando-se o cuidado de manter as fibras musculares dispostas longitudinalmente no eixo maior do fragmento. Esses fragmentos foram congelados por imersão em n-hexana resfriada a -70°C em nitrogênio líquido pelo método de congelamento de tecido não fixado⁽²¹⁾ e armazenados em botijão de nitrogênio.

Dos 22 fragmentos foram confeccionadas 22 lâminas, com cortes de oito μm de espessura, coradas pela hematoxilina e eosina⁽²²⁾, para avaliação das seguintes características: forma, tamanho, posição dos núcleos, coloração do sarcoplasma e presença de hiperplasia, conforme metodologia já descrita na literatura⁽²³⁻²⁵⁾. Para avaliação do grau de hipertrofia das fibras musculares foi utilizado o método da mensuração do menor diâmetro em amostras de 120 fibras por animal, pelo sistema de análise de imagem computadorizada, através do *software Image Pro-Plus*, seguindo os critérios de Dubowitz *et al.*⁽²⁶⁾.

Para demonstração da atividade nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio reductase (NADH-TR), que indica a presença da atividade oxidativa, foi avaliado o teor de formazana no sarcoplasma das fibras, tendo-se utilizado a técnica de Pearse modificada por Dubowitz e Broke⁽²⁷⁾.

Os valores do menor diâmetro das fibras musculares foram comparados por análise de variância bifatorial, com os fatores estado de treinamento (sedentário e treinado) e droga (esteróide anabolizante e óleo mineral), seguida do teste T-LSL para comparações múltiplas de médias. Valores de p menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

RESULTADOS

Nas lâminas dos animais do grupo sedentário que recebeu óleo mineral (NTO) verificou-se a presença de fibras musculares com contornos poligonais, núcleos em posição periférica e padrão fascicular normal. Nas lâminas dos animais do grupo sedentário que recebeu esteróide (NTA) observou-se a presença de fibras polimórficas, hialinizadas e fagocitadas (figura 1). Nas lâminas dos animais do grupo treinado que recebeu óleo mineral (TO) observaram-se regiões com aspecto normal e áreas com fibras musculares em fase final de fagocitose e fibras anguladas, com tendência a arredondamento (figuras 2 e 3). Nas lâminas do grupo treinado que recebeu esteróide (TA) observou-se aumento das fibras hipertróficas, com núcleo central e de fibras arredondadas, com aparecimento, inclusive, do *splitting*. Observou-se também presença de fibras angulosas atroficas em processo de fagocitose, além de fibras hipertróficas e hialinizadas (figuras 4 e 5).

Na avaliação da atividade oxidativa do grupo NTO verificou-se que a maioria das fibras apresentava padrão normal para a reação. Nos animais dos outros grupos NTA, TO e TA observou-se aumento da atividade enzimática, sendo mais intenso no grupo TA, caracterizada pela presença de grânulos corados em azul (formazana) que se depositaram nos locais onde estavam as mitocôndrias, em geral na periferia das células (figura 6).

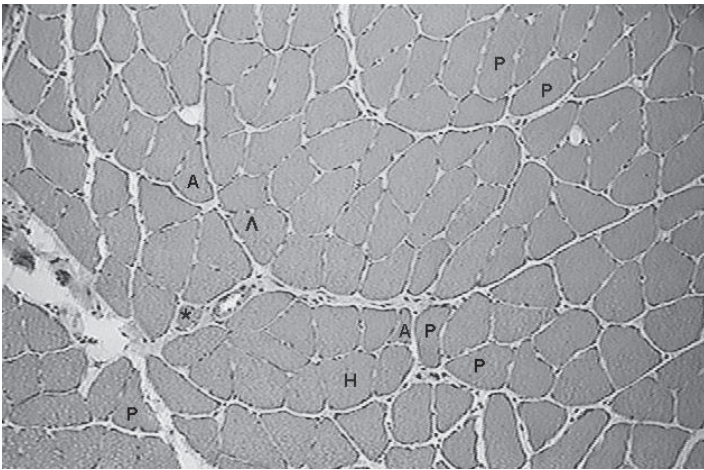


Figura 1 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato sedentário submetido à administração de esteróide. Observam-se fibras poligonais, núcleos periféricos e padrão fascicular. Maior extensão do comprometimento morfológico: fibras polimorfas (P), fibras angulares atroficas pequenas (A) ao lado de hipertroficas (H), fibras em processo de splitting (^) e processo de fagocitose(*) (HE 200x).

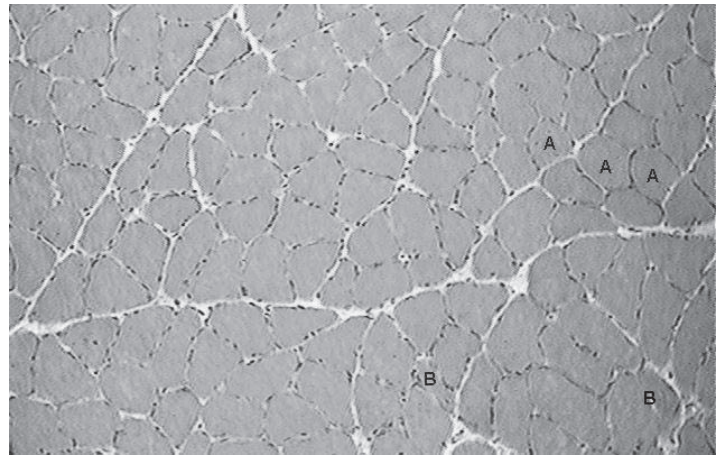


Figura 2 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato treinado submetido à administração de óleo mineral. Observam-se fibras com aspectos normais e áreas com fibras angulosas com polimorfismo (B), com tendência a arredondamento (A) e endomísio aumentado (HE 200x).

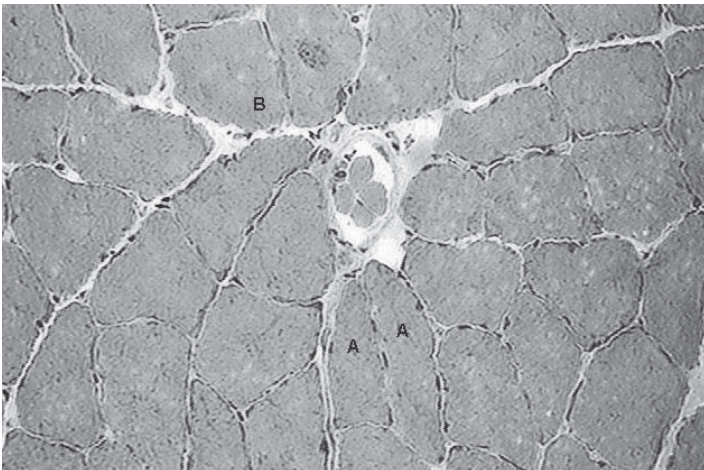


Figura 3 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato treinado submetido à administração de óleo mineral. Observa-se processo de fagocitose em fase inicial (B) e presença de fibras polimorfas (A) (HE 500x).

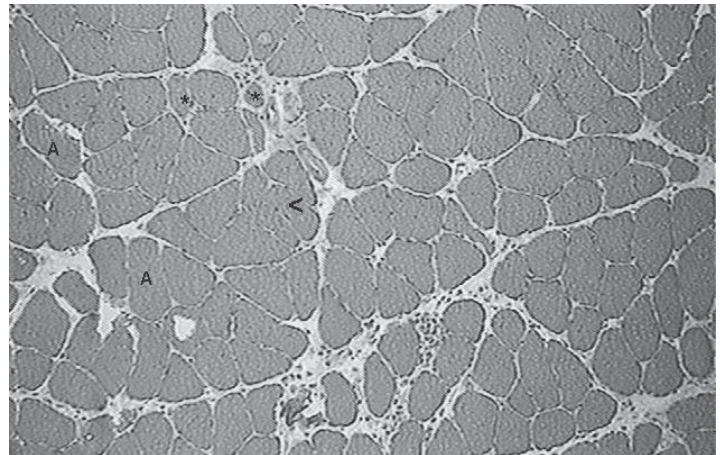


Figura 4 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato treinado submetido à administração de esteróide. Observa-se afastamento de fibras musculares, reação inflamatória, aumento do número de núcleos, fagocitose com perda de fibras musculares (*), splitting (<) e polimorfismo de fibras (A) (HE 200x).

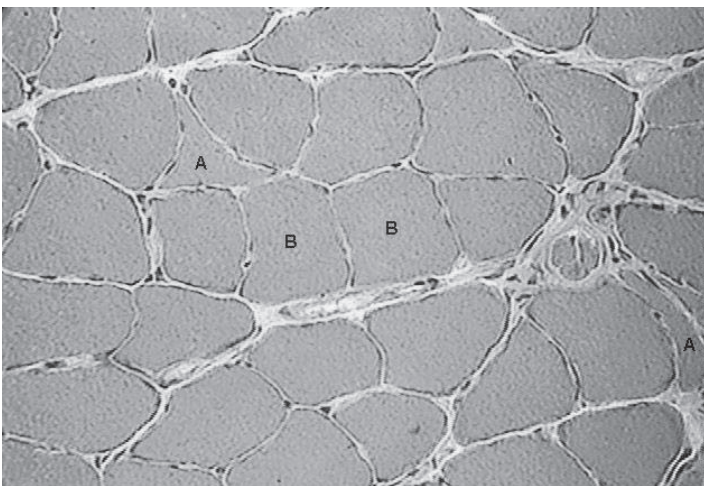


Figura 5 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato treinado submetido à administração de esteróide. Observam-se fibras angulosas atroficas (A) e hipertroficas (B) (HE 500x).

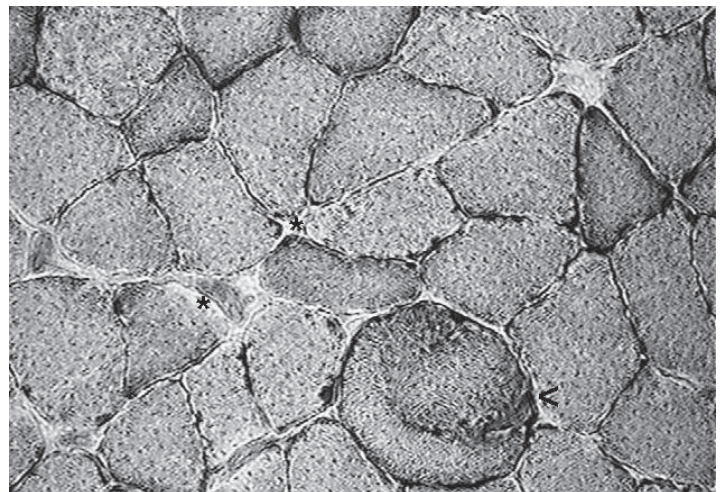


Figura 6 – Secção transversal da região mediana do m. sóleo de rato treinado submetido à administração de esteróide. Observam-se distribuição irregular do produto da reação, fibras com perda da atividade enzimática (*) e presença de agregados amorfos no interior das fibras (<) (NADH-TR - 500x).

As análises da medida do diâmetro das fibras musculares mostraram diferenças significativas para o fator estado de treinamento ($F = 14,23$; $p = 0,0014$), enquanto que não observamos diferenças entre o fator droga ($F = 0,01$; $p = 0,9391$) e a interação estado de treinamento x droga ($F = 0,57$; $p = 0,4606$). O teste T-LSD mostrou que a medida do menor diâmetro das fibras musculares dos animais dos grupos TA e TO foi significativamente diferente quando comparada com os seus respectivos controles (tabela 1).

TABELA 1
Valores médios, acompanhados dos respectivos desvios-padrões, medidos em micrômetros, do menor diâmetro das fibras do músculo sóleo dos animais dos grupos experimentais e controles

Grupo	Valor médio	Desvio-padrão
NTA	38,98	2,08
NTO	38,40	1,22
TA	41,94*	2,33
TO	42,83*	3,34

NTA = não treinado anabolizante, NTO = não treinado óleo; TA = treinado anabolizante, TO = treinado óleo. *Valores médios estatisticamente significantes em comparação com seu respectivo controle ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial + teste T-LSD).

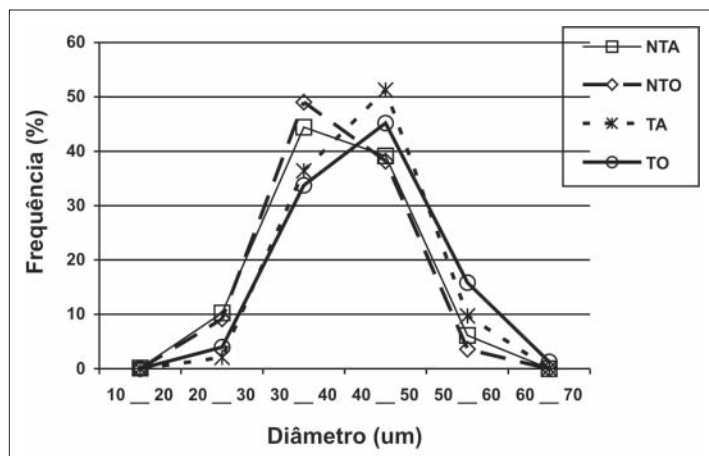


Figura 7 – Distribuição percentual da quantidade de fibras musculares nos vários diâmetros das fibras entre os grupos experimentais e controles

Em todos os grupos estudados o diâmetro das fibras musculares variou de 30 a 50mm. Nos grupos não treinados essa faixa variou de 30 a 40mm, enquanto que nos treinados (com e sem o uso de esteróides) variou de 40 a 50mm (figura 7).

DISCUSSÃO

Os achados histológicos mostraram que a administração do esteróide produziu lesão muscular no grupo sedentário, enquanto que a administração do óleo mineral não causou lesão nesse grupo. Nos grupos treinados, lesões musculares foram observadas em ambos os grupos, sendo mais evidentes nos animais submetidos à administração de esteróide. Essas lesões foram caracterizadas, principalmente, pela presença de células arredondas, com *splitting*, e células fagocitadas.

Por outro lado, a análise das lâminas preparadas pela reação enzimática (NADH-TR) demonstrou aumento da atividade metabólica celular não só nos grupos treinados, mas também no grupo sedentário em que havia sido administrado o esteróide, mostrando que essa substância pode acelerar o metabolismo celular.

Nos animais do grupo sedentário com administração de anabolizante foram observadas acentuada perda de atividade NADH-TR e fibras atroficas com atividade reativa fraca, o que está relacionado a uma menor oxidação no sistema $NADH_2$. A menor atividade

oxidativa da fibra pode estar relacionada à lesão muscular. Foram observados também agregados amorfos de formazana em posição mais central à fibra, indicando o deslocamento de mitocôndrias.

Em ambos os grupos treinados também foram observadas perda de atividade enzimática e distribuição irregular do produto da reação. Além disso, nos animais treinados com o esteróide houve presença de agregados amorfos e fibras angulosas e atroficas com reação mais intensa.

Exercícios físicos produzem lesões nos músculos esqueléticos, acompanhadas de dor, edema e fadiga, principalmente durante atividades em que forças excêntricas e elevados picos de contrações são solicitados⁽²⁸⁻³¹⁾. No presente estudo, algumas dessas características parecem ter ocorrido, especialmente no exercício mais prolongado, quando os animais demonstravam tendência a apoiar os membros pélvicos no fundo do tanque para impulsionar o corpo para cima.

Assim, os animais da presente pesquisa mostraram quadro de estresse mecânico, que é um dos principais fatores que podem acarretar dano muscular durante o exercício⁽³⁰⁾.

Com relação à morfometria das fibras, os resultados mostram que não ocorreram diferenças significativas nos diâmetros das fibras do músculo sóleo dos animais sedentários submetidos à administração de esteróide quando comparados com os animais sedentários que receberam óleo mineral, o que difere do observado no músculo gastrocnêmio de ratos sedentários onde a administração de anabolizante, com dose oito vezes a dose terapêutica, produziu hipertrofia de fibras do tipo IIb desse músculo⁽³²⁾.

Neste estudo o menor diâmetro das fibras musculares foi mensurado em lâminas coradas com HE; portanto, não foi mensurado o diâmetro dos vários tipos de fibras. Uma vez que o músculo sóleo apresenta predomínio de fibra tipo I⁽³³⁾, que tem metabolismo oxidativo e menor diâmetro, a hipertrofia poderia ocorrer em maior grau nas fibras tipo II, o que parece explicar o aumento não significativo das médias dos diâmetros das fibras avaliadas.

Nos animais que foram submetidos ao treinamento físico com e sem a administração do esteróide anabólico, observou-se aumento significativo do diâmetro das fibras musculares em comparação com os animais que não foram submetidos à natação, sem diferenças significativas entre eles, o que demonstra que esse aumento foi induzido pelo treinamento físico e não pela administração do esteróide.

O aumento de força muscular e, conseqüentemente, hipertrofia das fibras pelo uso de esteróides, ocorre quando sua administração é associada a um treinamento físico intenso e uma dieta hipercalórica e hiperprotéica⁽¹¹⁾. Isso parece não ter sido observado neste trabalho, pois a dieta empregada neste estudo possui uma composição química balanceada (Ração Probiotério – Marca *Primus*) e o exercício utilizado não foi de alta intensidade.

Outro fator que pode também estar relacionado aos resultados apresentados neste trabalho é a dose da droga utilizada, pois as fibras musculares apresentam diferentes reações, dependendo da dose aplicada. Como exemplo disso, a administração de decaonato de nandrolona, diariamente, por cinco semanas, em dois grupos de ratos tratados com baixas doses (1,5mg/kg) e altas doses (7,5mg/kg), produziu aumento das fibras tipo I somente nos animais tratados com baixas doses e hipertrofia das fibras tipo IIb nos animais tratados com altas doses⁽³⁴⁾. Em nossos experimentos, utilizamos uma dose de 5mg/kg, que é próxima da dose utilizada por Bisschop *et al.*⁽³⁴⁾ para produzir hipertrofia das fibras tipo IIb.

Associada a esses fatores, a ação do anabolizante parece ser seletiva, induzindo maior alteração no diâmetro de certos tipos de fibras musculares, como relatado por Furumura⁽³⁵⁾ e Calis⁽³²⁾, os quais mostraram que o uso de esteróide (*Stanozool*) associado a treinamento físico por natação provocou hipertrofia das fibras musculares do tipo II, sendo que as fibras do tipo I apresentaram somente hipertrofia moderada.

Considerando esses achados, o aumento de diâmetro pode ter ocorrido mais intensamente nas fibras tipo II. No entanto, no músculo sóleo há maior predominância de fibras tipo I⁽³³⁾ e, devido a isso, a hipertrofia induzida pela droga não seria tão evidente para produzir alteração na média dos diâmetros das fibras musculares desse músculo.

Outro fator que pode ter contribuído para a pequena ação anabólica sobre as fibras do músculo sóleo nos animais treinados pode estar relacionado à predominância de receptores de esteróides em determinadas regiões do corpo e à diferença existente entre as espécies animais^(36,37).

Neste trabalho o incremento de carga ao longo do treinamento foi produzido pelo aumento do tempo de treinamento e não por sobrecarga externa, como utilizado em outros trabalhos^(38,39). Acreditamos que o incremento de carga externa durante o treinamento poderia acentuar as alterações observadas, devido à maior sobrecarga a que esses animais seriam submetidos. Aumentos de lesões musculares durante o exercício são dependentes da duração e da intensidade do treinamento⁽⁴⁰⁾.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que o acometimento do tecido muscular por alterações morfológicas características de processos de lesão e perda de atividade enzimática das fibras ocorreram mais intensamente nos animais dos grupos em que se administrou a droga, quando comparados com seus respectivos controles. Em relação à medida do diâmetro das fibras musculares do sóleo, ambos os grupos treinados apresentaram diâmetros equivalentes e maiores que os observados nos animais sedentários, indicando que o aumento do diâmetro das fibras musculares nesses animais ocorreu em função do exercício físico e não pela administração do esteróide anabolizante.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic syndromes associated with use of anabolic steroids. *Am J Psychiatry* 1988;145:487-90.
2. Hall RCW, Hall RCW. Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *South Med J* 2005;98(5):550-5.
3. Moores J. Anabolic steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14:55-69.
4. Lichtenbelt VM, Wouter D, Hartgens F, Vollaard NBJ, Ebbing S, Kuipers H. Body-builders' body composition: effect of nandrolone decanoate. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(3):484-9.
5. Wagner JC. Abuse of drugs used to enhance athletic performance. *Am J Hospital Pharmacy* 1989;46:2059-67.
6. Yesalis CE, Bahrke MS. Anabolic-androgenic steroids. *Sports Med* 1995;19:326-40.
7. Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE. Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart* 2004;90:473-5.
8. McGinnis MY. Anabolic androgenic steroids and aggression: studies using animal models. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1036:399-415.
9. Gruber AJ, Pope Jr HG. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother Psychosom* 2000;69:19-26.
10. American College of Sports Medicine. The use anabolic-androgenic steroids in sports. *Med Sci Sports Exerc* 1987;19(5):534-9.
11. Haupt HA, Rovere GD. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am J Sports Med* 1984;12:469-84.
12. Taylor DC, Brooks DE, Ryan JB. Anabolic-androgenic steroid administration causes hypertrophy of immobilized and nonimmobilized skeletal muscle in a sedentary rabbit model. *Am J Sports Med* 1999;27:718-26.
13. Östman-Smith I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effectors organs of the rat following long-term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol Scand* 1979;477:1-118.
14. Garcia-Marquez C, Armario A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav* 1987;40:33-8.
15. Skinner A, Thompson A. Duffield: exercícios na água. 3ª ed. Manole: São Paulo, 1988.
16. Edlich RF, Towler MA, Goitz RJ, Wilder RP, Buschbacher LP, Morgan RF, et al. Bioengineering principles of hydrotherapy. *J Burn Care Rehabil* 1987;8(6):580-4.
17. Champion MR. Adult hydrotherapy: a practical approach. Oxford: Heinemann Medical Books, 1990.
18. Norton GR, Trifunovic B, Woodiwiss AJ. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *Eur J Appl Physiol* 2000;81:310-6.
19. Linard M. Estudo da sensibilidade aos efeitos cronotrópico e inotrópico das catecolaminas em átrios isolados de ratos submetidos a treinamento físico [Dissertação]. Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas, 1992.
20. Marshall S, Milligan A, Yates R. Experimental techniques and anesthesia in the rat and mouse. *Anzccarte Facts Sheet Anzccart News* 1994;7:4.
21. Dal Pai V. Histoenzimologia: teoria e prática. Instituto de Biociências – Unesp, Botucatu, 1995.
22. McManus JFA, Mowry RW. Staining methods: histologic and histochemical medical division. New York: Harper & Brothel, 1960:283-310.
23. Fridén J, Liber RL. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24(5):521-30.
24. Antonio J, Gonyea WJ. Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25(12):1333-45.
25. Sartori JR, Gonzales E, Macari M, Dal Pai V, Oliveira HN. Tipos de fibras no músculo flexor longo do hálux de frangos de corte submetidos ao estresse pelo calor e frio e alimentados em "pair-feeding". *Rev Brasil Zootecnia* 2003;32(4): 918-25.
26. Dubowitz V, Brooke MH, Neville H. Muscle biopsy: a modern approach. London: Saunders Co. Ltd., 1972:471.
27. Dubowitz V, Brooke MH. Muscle biopsy: a practical approach. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 1985.
28. Clarkon PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24(5):512-20.
29. Jones DA, Newham DJ, Round JM, Tolfree SE. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *J Physiol* 1986;375:435-48.
30. Kuipers, H. Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 1994;15:132-5.
31. Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 1991;12:184-207.
32. Calis JFF. Medidas da área de fibras musculares do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos ao exercício de natação e administração de esteróide anabólico para quantificar a hipertrofia em fibras tipo I e tipo II [Monografia]. Instituto de Biociências: Universidade Estadual Paulista, 1995.
33. Guyton AC. Fisiologia humana. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
34. Bisschop A, Gayan-Ramirez G, Rollier H, Dekhuijzen PN, Dom R, De Bock V, et al. Effects of nandrolone decanoate on respiratory and peripheral muscles in male and female rats. *J Appl Physiol* 1997;82(4):1112-8.
35. Furumura MT. Quantificação de hipertrofia muscular em fibras tipo I e II do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a um exercício físico de natação e a um esteróide anabólico [Monografia]. Instituto de Biociências: Universidade Estadual Paulista, 1994.
36. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987;8:1-28.
37. Celotti F, Cesi PN. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:469-77.
38. Saad PCB, Guimarães A, Dal Pai V, Kroll LB. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício de natação. *Rev Bras Med Esporte* 2002;8(4):144-50.
39. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(12):1909-17.
40. Dal Pai V. Esporte e lesão muscular. *Rev Brasil Neurol* 1994;30(2):45-8.