



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**JOSÉ ROBERTO CARDOSO MEIRELES**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE ESTERÓIDES  
ANABOLIZANTES SINTÉTICOS COM USO DO TESTE DE  
MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS  
(*Mus musculus*)**

Feira de Santana, BA  
2012

**JOSÉ ROBERTO CARDOSO MEIRELES**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE ESTERÓIDES  
ANABOLIZANTES SINTÉTICOS COM USO DO TESTE DE  
MICRONÚCLEO EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS  
(*Mus musculus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eneida de Moraes Macílio Cerqueira  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Susie Vieira de Oliveira

Feira de Santana, BA  
2012

*... hoje a gente nem se fala, mas a festa continua ...*

Este trabalho é dedicado a minha mãe ... *a mais  
bonita das cabrochas dessa ala ...*

## AGRADECIMENTOS

A colaboração de diversas pessoas foi condição *sine qua non* para realização deste trabalho. A elas ficam os meus mais sinceros agradecimentos.

Profª Eneida de Moraes M. Cerqueira e Profª Susie Vieira de Oliveira, por acreditarem na minha proposta e aceitarem orientar-me com incondicional disponibilidade.

Maíza Alves Lopes que além de dispor a diluir as drogas, há doze anos contribui para tornar o Laboratório de Genética Toxicológica um ambiente amigável.

A equipe do Biotério Central da UEFS, especialmente Júnior que sempre esteve disponível, além de auxiliar significativamente no tratamento dos animais.

Bruno Sousa Pereira, Leonardo da Cunha M. Souza, Rodrigo dos Santos Rocha, Isis Freitas Ribeiro, Rosana Santos Matos e Laís Sena e Souza que auxiliaram nas etapas experimentais.

Prof. Antônio de Oliveira Costa Neto pelo auxílio na análise estatística.

*Eu posso engolir você, só pra cuspir depois.*  
(Paulo César Pinheiro)

## RESUMO

O uso de esteróides anabólicos androgênicos (EAA), visando o desenvolvimento rápido de massa muscular tem aumento em várias populações do mundo. Apesar dos benefícios potenciais destes medicamentos no tratamento de algumas doenças seu uso indiscriminado pode causar prejuízos para a saúde, como alterações cardiovasculares e nas funções hepáticas. Dados da literatura são controversos em relação à associação entre o uso de EAA e desenvolvimento de câncer. Considerando que o câncer é uma doença genética, decorrente de alterações em genes envolvidos com a proliferação e diferenciação celular, ou em genes envolvidos no reparo do DNA e apoptose, este estudo objetivou avaliar o potencial genotóxico dos EAA deca-durabolin®, deposteron® e durateston® usando o teste de micronúcleo em medula óssea de roedor. Camundongos machos Swiss com seis a oito semanas de idade foram tratados, por meio de injeção intramuscular, com cada droga em três concentrações diferentes: dose clínica (DC), dose clínica concentrada cinco vezes (DC 5X) e dose clínica concentrada dez vezes (DC 10X). Um grupo de animais tratado com ciclofosfamida foi utilizado como controle positivo (CP) e outro grupo (controle negativo), com óleo de milho (CN). Os animais foram sacrificados 24h, 48h e 72h depois do tratamento e imediatamente a medula óssea foi removida, processada e preparados esfregaços em lâminas para microscopia. Micronúcleos foram computados em 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) para avaliação de danos cromossômicos. Citotoxicidade foi avaliada pela determinação da relação PCE-NCE (eritrócito normocromático) em 200 eritrócitos/animal. A ocorrência de micronúcleo foi significativamente maior nos animais tratados com as drogas em maior concentração (DC 10X) em comparação com os outros grupos, exceto para o controle positivo. Além disso, esta concentração também induziu atraso no ciclo celular revelando efeito citotóxico. Estes resultados indicam que os EAA analisados induzem, em camundongos, lesões cromossômicas e são citotóxicos na dependência da concentração.

**Palavras-chave:** esteróides anabolizantes, micronúcleo, genotoxicidade, citotoxicidade

## ABSTRACT

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) aiming the rapid development of muscle mass has increased in several populations worldwide. In spite the potential benefits of these drugs in treating some diseases their indiscriminate use can cause damage to health, such as alterations in cardiovascular and liver functions. Data from literature are controversial in relation to the association between AAS use and cancer development. Considering that cancer is a genetic disease, resulting from alterations in genes involved with the cellular proliferation and differentiation, or in genes compromised with DNA repair and apoptosis, this study aimed to evaluate the genotoxic potential of three ASS: deca-durabolin®, deponerone® and durateston® using the micronucleus test in bone marrow of rodents. Swiss male mice six to eight weeks of age were treated, by intramuscular injection, with each drug at three different concentrations: clinical dose (DC), clinical dose concentrated five times (5X DC) and concentrated ten times the clinical dose (DC 10X). One group of animals was treated with cyclophosphamide as a positive control (CP) and another group (negative control) with corn oil (CN). Animals were sacrificed 24h, 48h and 72h after treatment and immediately bone marrow was removed, processed and prepared smears on slides for microscopy. Micronuclei were computed in 1000 polychromatic erythrocytes for assessment of chromosomal damage. Cytotoxicity was assessed by determining the ratio PCE-NCE (erythrocyte normochromatic) in 200 erythrocytes/animal. The occurrence of micronuclei was significantly higher in the animals treated with drugs at higher concentration (DC 10X) compared to the other groups, except for the positive control. Moreover, the drugs in this concentration also induced cell cycle delay revealing cytotoxic effects. These results indicate that AAS induces, in mice, chromosomal damage and cytotoxicity in concentration dependence.

**Keywords:** anabolic steroids, micronucleus, genotoxicity, cytotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	9
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	11
<b>3 CAPÍTULO 1</b>	15
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS	26
<b>4 CAPÍTULO 2</b>	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	41
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b>	45
<b>REFERÊNCIAS</b>	46
<b>ANEXOS</b>	50

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são compostos químicos derivados sintéticos da testosterona (GOLDBERG *et al.*, 2000) que possuem atividade anabólica superior à androgênica (SU *et al.*, 1993). Estas substâncias aumentam a síntese protéica, a oxigenação e o armazenamento de energia, resultando em rápido incremento da massa muscular e de sua capacidade de trabalho (FERRFINDEZ *et al.*, 1996; IRIART e ANDRADE, 2002). Estas propriedades as tornam bastante sedutoras pelos que objetivam aumento da força física e da massa muscular em tempo significativamente menor ao que se daria apenas com preparação física.

Assim, o uso de EAA tem sido disseminado em diversos níveis sociais, incluindo esportistas profissionais ou não (TENTORI e GRAZIANI, 2007) e praticantes de musculação (IRIART e ANDRADE, 2002), constituindo-se em um problema social e de saúde pública. Diversos estudos têm relatado associação entre o consumo de EAA e alterações comportamentais (STEENSLAND *et al.*, 2005), dependência a outras drogas (CÉLÉRIER, *et al.*, 2006) e diversas doenças (MARAVELIAS, *et al.*, 2005; LILJEQVIST, *et al.*, 2008).

Os efeitos adversos à saúde decorrentes do uso de EAA mais consistentemente documentados são as complicações cardiovasculares, gastrointestinais, hematológicas e alterações no ciclo menstrual (STURMI e DIORIO, 1998). Entretanto, estudos apontam para a ocorrência de tumores em fígado (STURMI e DIORIO, 1998; MOTTRAM e GEORGE, 2000) e testículo (LESHNER, 2000). Estes resultados sugerem que os EAA podem ser potencialmente carcinogênicos, seja por causar alterações gênicas e/ou cromossômicas ou devido ao seu efeito em promover divisão nuclear, como relatado por Eriksson *et al.* (2005).

A avaliação do potencial mutagênico dos EAA é de grande importância porque o consumo indiscriminado destas substâncias pode contribuir para o aumento na incidência de câncer, uma vez que esta é uma doença genética decorrente de alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular (proto-oncogenes e supressores de tumor), no reparo do DNA (genes mutadores) e na apoptose (WEINBERG, 2000). Devido à disseminação destas substâncias entre praticantes não-profissionais de atividade física, a maior incidência dessa doença não se restringirá aos esportistas profissionais. Além disso, a doença poderá acometer populações mais jovens, haja vista o crescente uso de EAA entre adolescentes (IRVING *et al.*, 2002).

Os testes citogenéticos capazes de detectar danos cromossômicos constituem-se em

efetivas ferramentas biotecnológicas na detecção de instabilidade genética indicativa de maior probabilidade de desenvolvimento de câncer. Segundo Rabello-Gay, Rodrigues e Monteleone-Neto (1991), dentre os testes desta natureza, o Teste de Micronúcleo é um dos mais promissores. Este teste pode ser aplicado utilizando diversas linhagens celulares de diferentes organismos, incluindo células esfoliadas da mucosa oral (HOLLAND *et al.*, 2008) e linfócitos (IARMARCOVAI *et al.*, 2008) em humanos, e eritrócitos de camundongos (BUTRYEE e KUPRADINUN, 2008).

O Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongo é amplamente utilizado na avaliação da ação genotóxica de substâncias químicas (PEREIRA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2007; ACEVEDO *et al.*, 2006). Os micronúcleos (MN) são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e, assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE *et al.*, 1973). Na telófase essas regiões cromossômicas são incluídas nas células filhas onde podem fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais pequenos núcleos secundários no citoplasma - os micronúcleos (SARTO *et al.*, 1987). Desse modo, MN pode ser considerado um marcador biotecnológico eficaz na avaliação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de agentes potencialmente genotóxicos.

O uso de modelos animais é particularmente importante para avaliação da genotoxicidade quando populações humanas estão expostas a diversas substâncias, situação que pode mascarar ou maximizar os efeitos da substância alvo da investigação. Esta dificuldade metodológica é encontrada na avaliação dos efeitos de EEA, uma vez que, é comum os usuários consumirem diversos tipos destas drogas simultaneamente (STURMI e DIORIO, 1998), em dosagem e frequência variáveis (IRIART e ANDRADE, 2002). Assim, estudos em animais de laboratório são importantes para avaliar a ação dos EAA (WOOD, 2004)

Considerando a carência de informações sobre a genotoxicidade dos EAA, substâncias de uso cada vez mais frequente na sociedade atual; a eficácia do Teste de Micronúcleo na identificação de danos cromossômicos e a positiva relação entre danos ao DNA e a iniciação do câncer, objetivou-se com o desenvolvimento deste projeto, avaliar utilizando o Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongo, a genotoxicidade dos três principais EAA injetáveis (deca-durabolin<sup>®</sup>, deposteron<sup>®</sup> e durateston<sup>®</sup>) utilizados por esportistas, segundo o National Institute on Drug Abuse (NIDA, 2001).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O crescente uso de EAA no esporte tem registro amplo na literatura (MARAVELIAS, *et al.*, 2005; SMURAWA e CONGENI, 2007; THEVIS, KOHLE e SCHÄNZER, 2008). Em geral os atletas utilizam estes produtos com o objetivo de superar seus limites físicos e vencer competições “a todo custo” (STURMI e DIORIO 1998). Assim por questões éticas os EEA representam grande problema nas competições profissionais.

A despeito das questões éticas, que *per se* justificariam ações de controle e penalidades pelo uso de EAA, estas substâncias extrapolaram as fronteiras do atletismo profissional sendo cada vez mais freqüentes entre não-atletas (SJÖQVIST, GARLE e RANE, 2008). Este fato torna o uso de EAA uma questão de saúde pública, uma vez que há consistentes relatos de problemas de saúde, inclusive morte prematura (PETERSSON *et al.*, 2006) entre usuários destas substâncias.

Nas duas últimas décadas, tem sido relatado que o uso de EAA pode contribuir para o comportamento agressivo e violento (CORRIGAN, 1996). Klötz *et al.* (2007), realizaram estudo objetivando analisar a relação entre mortes decorrentes de crimes violentos e uso de EAA. Neste estudo os autores concluíram que o uso de EAA contribuiu para a alta taxa de envolvimento em crimes violentos dos usuários destas substâncias, especialmente quando combinado com o uso de outras substâncias ilegais.

O uso de EAA associado a outras substâncias ilegais foi identificado por Iriart e Andrade (2002) e há evidência de que o consumo de EAA predispõe o indivíduo ao uso e dependência de opiáceos (WOOD, 2008). Em um estudo de revisão de literatura Wood (2008) concluiu que os EAA atuam alterando o sistema de neurotransmissores de opiáceos endógenos causando dependência de drogas exógenas em humanos e animais experimentais. Devido a esta associação os problemas de saúde podem ser agravados entre os usuários.

Na literatura são registrados diversos problemas à saúde decorrentes do uso de EAA, entre os quais se destacam: fechamento prematuro das epífises ósseas em adolescentes (CATLIN e MURRAY, 1996), disfunção hepática (FRIEDL, 2000; SNYDER, 2001) e tumores de fígado (MOTTRAM e GEORGE, 2000).

O potencial carcinogênico dos EAA é sugerido pelos autores que associam câncer e uso dessas substâncias (LAMB, 1989; HICKSON, BALL e FALDUTO, 1989). Entretanto os estudos que avaliaram a genotoxicidade dos EAA são poucos e controversos. Em estudo de revisão de literatura Joosten, *et al.* (2004), relacionaram sete EAA para os quais pesquisas

quanto ao potencial genotóxico haviam sido realizadas. Os resultados são controversos. Na maioria destas pesquisas há autores que identificam lesões no DNA decorrentes da exposição aos EAA, enquanto outros não encontraram tal associação. Deste modo, Joosten, *et al.* (2004) apontam para a necessidade da realização de outros estudos, uma vez que, segundo esses autores, a genotoxicidade dos EAA tem sido pouco estudada. Além disso, não está claro se os EAA promovem divisão celular o que aumenta a chance de erros durante a replicação (promoção do câncer) ou se estes produtos atuam diretamente induzindo alterações genéticas.

O esclarecimento acerca da genotoxicidade dos EAA é de significativa relevância, uma vez que, como exposto anteriormente, o uso destes produtos é crescente na sociedade. Este conhecimento poderá subsidiar práticas de controle e tratamento, além de contribuir para o foco das campanhas educativas que visem estimular a prática esportiva saudável, profissional ou não, em detrimento à utilização de substâncias exógenas.

Dentre as doenças associadas ao uso de EAA, o câncer é uma das mais controversas. Embora já tenha sido relatado o maior risco de câncer entre usuários (HAUPT e ROVERE, 1984; HICKSON, BALL e FALDUTO, 1989), a ação destas substâncias na iniciação e desenvolvimento da doença não é clara, uma vez que estudos com objetivo de avaliar a genotoxicidade e/ou carcinogenicidade dos EAA são poucos (JOOSTEN, *et al.*, 2004). Alguns autores, entretanto têm relatado alterações genéticas que corroboram com a possível atividade genotóxica e/ou carcinogênica dos EAA.

Mattioli *et al.* (2004), expuseram hepatócitos de ratos em cultura a concentrações de 10 $\mu$ M a 90 $\mu$ M de quatro esteróides (*cyproterone acetate*, *chlormadinone acetate*, *megestrol acetate* e *potassium canrenoate*) e avaliaram com uso do Teste Cometa a genotoxicidade destas substâncias. Estes autores demonstraram que o nível de fragmentação ao DNA foi significativamente maior, inclusive em relação a dose aplicada, nas células expostas em comparação com as culturas que não receberam tratamento com os esteróides. Desse modo, os pesquisadores apontam para a ação genotóxica e, possivelmente, carcinogênica, das substâncias analisadas.

O potencial carcinogênico de hormônios esteróides foi também sugerido por Seraj *et al.* (1996). Este grupo de pesquisadores japoneses identificou em cultura de células de fígado humano que diversos hormônios esteróides formam ligações covalentes com o DNA. Estes complexos denominados adutos de DNA podem ocasionar mutações, que uma vez ocorrendo em genes envolvidos com o controle da proliferação celular podem estar relacionados com a iniciação do câncer.

Nantermet *et al.* (2004) relataram que, em ratos, o esteróide 5 $\alpha$ -dihidrotestosterone

na concentração 3 mg/kg causa decréscimo no nível de p53 em células da próstata. Segundo Weinberg (2000), mutações no gene da p53 podem antecipar o aparecimento de uma malignidade plenamente desenvolvida porque nesta situação a proliferação das células tumorais será grandemente acelerada. A perda da proteína p53 pode ser tão devastadora para a estabilidade do genoma quanto um defeito grave no mecanismo de reparo de DNA (WEINBERG, 2000).

O efeito genotóxico de quatro EAA (*testosterona, methyltestosterona, stanozolol e oxymetholona*) foi avaliado por Martelli *et al.* (2003). Estes autores analisaram a ação destas substâncias sob o sistema de reparo do DNA em hepatócitos *in vitro* de ratos e humanos. Os resultados, segundo os autores, foram controversos. Em concentração de 50µM de testosterona, por exemplo, não foi identificada indução de reparo em hepatócitos de ratos, mas induziu ativação do reparo em células de humanos. Entretanto *stanozolol* e *oxymetholona* induziram reparo em células de ratos e não de humanos. Desse modo, os autores sugerem que novas avaliações de genotoxicidade devem ser realizadas.

A utilização de testes de mutagenicidade tem revelado a alguns pesquisadores a natureza não mutagênica de hormônios androgênicos (DHILLON *et al.* 1994; HOLDEN, STUDWELL e MAJESKA, 1999) apontando, desse modo, para uma possível ação carcinogênica destes compostos por via epigenética (MARTELLI *et al.*, 2003). Entretanto segundo Martelli *et al.* (2003), ação genotóxica não deve ser descartada, uma vez que testes de clastogenicidade têm revelado resultados positivos.

Dhillon *et al.* (1995) avaliaram em cultura de linfócitos humanos a genotoxicidade do esteróide androgênico *fluoxymesterona* utilizando os *endpoints* Troca de Cromátides Irmãs (SCE) e Micronúcleo (MN). Os autores identificaram, em culturas expostas, frequências de SCE e MN significativamente maiores. Resultados similares foram obtidos quando os pesquisadores analisaram SCE e MN em Eritrócitos Policromáticos (PCE) em camundongos. Assim os autores concluíram que o esteróide apresentou evidente ação clastogênica.

A despeito destes estudos nos quais pesquisadores associaram positivamente danos genéticos à exposição a esteróides androgênicos, outros autores não relataram tal associação (REIMANN *et al.*, 1996; HOLDEN, STUDWELL e MAJESKA, 1999). Reimann *et al.* (1996) realizaram estudo citogenético para avaliar o potencial genotóxico de dez esteróides sexuais, entre os quais dois androgênicos (*atamestane e propylmesterolone*), com o uso do Teste Aberrações Cromossômicas em Linfócitos Humanos *in vitro* e Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongo. Em ambos os testes os esteróides sexuais não

apresentaram potencial genotóxico detectável. Resultados similares foram obtidos por Holden, Studwell e Majeska (1999) na avaliação da genotoxicidade do esteróide *oxymetholona*.

A ação genotóxica dos EAA que foram analisados com o desenvolvimento deste estudo tem registro escasso na literatura. Pavão *et al.* (2007) avaliaram utilizando o Teste Cometa a possível ação genotóxica dos EAA deposteron<sup>®</sup>, durateston<sup>®</sup> e deca-durabolin<sup>®</sup> e não identificaram níveis significativos de danos genéticos em células de sangue periférico de fisiculturistas. Entretanto os autores advertem que os mecanismos e as conseqüências da genotoxicidade induzida por agentes químicos envolvem processos complexos.

A toxicidade e alterações fisiológicas decorrentes da exposição a estes produtos em humanos e modelos animais tem sido registrada. Karbalay-Doust e Noorafshan (2009) em um estudo no qual aplicaram doses de 3 mg/kg de deca-durabolin<sup>®</sup> em fêmeas de camundongos e observaram, após uma semana da exposição, aumento no volume do fígado, principalmente devido hiperplasia dos hepatócitos. Alterações cardiovasculares foram relatadas por Dornas *et al.* (2008) em uma revisão de literatura sobre efeitos adversos do deposteron<sup>®</sup>. Silva *et al.* (2000) após tratamento de fêmeas de camundongo com propionato de testosterona demonstraram que este EAA produziu atrofia no epitélio mamário.

Apesar da controversa acerca da genotoxicidade dos esteróides androgênicos, a relação positiva entre exposição a estas substâncias e o maior risco de desenvolvimento de câncer é registrada na literatura, como descrito anteriormente. Assim, estudos visando esclarecer o potencial dos EAA em danificar o DNA são de significativa relevância, uma vez que o câncer é uma doença genética.

### 3 CAPÍTULO 1

#### **Dano cromossômico e efeito citotóxico dos esteroides anabolizantes decanoato de nandrolona e ciponato de testosterona em camundongos (*Mus musculus*)<sup>1</sup>**

##### RESUMO

O uso de Esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA) objetivando desenvolvimento rápido de massa muscular tem aumentado em diversas sociedades. Embora muitas destas drogas apresentem ação eficaz no tratamento de diversas doenças o uso indiscriminado pode desencadear prejuízo à saúde, a exemplo de alterações cardiovasculares, disfunções hepáticas e câncer. Assim, diversos pesquisadores têm investigado a ação mutagênica destas substâncias, uma vez que o câncer é uma doença genética decorrente de alterações em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA, controle da proliferação e diferenciação celular. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar o potencial genotóxico dos EAA deca-durabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup> (decanoato de nandrolona e ciponato de testosterona, respectivamente) com uso do Teste de Micronúcleo em medula óssea de roedor. Camundongos machos Swiss com seis a oito semanas de idade receberam injeções intramuscular de deca-durabolin<sup>®</sup> ou deposteron<sup>®</sup> em três concentrações. Um grupo controle positivo foi tratado com ciclofosfamida e outro (controle negativo) com veículo de diluição da droga (óleo de milho). Os animais foram sacrificados 24h, 48h e 72h após tratamento e imediatamente procedeu-se à retirada e processamento da medula óssea para computo da ocorrência de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (PCE). Efeitos citotóxicos foram investigados pela determinação da relação PCE-NCE (eritrócito normocromático) através da análise de duzentos eritrócitos/animal. A análise estatística revelou que nos animais tratados com as drogas em maior concentração (10X a dose clínica recomendada pelo fabricante) a ocorrência de micronúcleo foi significativamente maior em relação a todos os demais grupos, exceto o controle positivo. O número de micronúcleos nos outros grupos tratados com deca-durabolin<sup>®</sup> ou deposteron<sup>®</sup> não diferiu em relação ao controle negativo, nem entre eles. Observou-se também que a concentração mais alta provocou redução na relação PCE/NCE indicando indução de atraso do ciclo celular. A análise destes resultados

---

<sup>1</sup> Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico *Mutagenesis* (anexo I)

permite concluir que os anabolizantes deca-durabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup> têm efeito genotóxico e citotóxico dependendo da concentração em que é administrado.

Palavras-chave: cipionato de testosterona, decanoato de nandrolona, genotoxicidade, micronúcleo, citotoxicidade.

## Introdução

Esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) são compostos químicos sintéticos derivados de modificações na estrutura da testosterona produzidos para melhorar a atividade anabólica em relação à ação androgênica deste hormônio (1). Estes compostos foram sintetizados a partir de 1935 com a descoberta da testosterona e, embora a dissociação completa da ação androgênica e anabólica não tenham sido alcançadas, têm apresentado significativa atividade anabólica e reduzida androgenicidade (2).

A partir de 1950 os EAA foram incluídos como parte do tratamento de diversas doenças. Há relatos de terapia androgênica no tratamento do hipogonadismo (3), retardo de crescimento e da puberdade (4), câncer de mama (5) e doenças cardiovasculares (6). Também data dessa década o início do uso destas drogas em competições esportivas (7) devido aos seus efeitos no ganho de força e massa muscular, além de proporcionarem perda de gordura corporal. Estes efeitos “seduziram” outras populações, de modo que alta incidência de uso tem sido identificada em atletas recreacionais (8) e praticantes de musculação (9).

A disseminação dos EAA tornou estas drogas um problema de saúde pública devido aos efeitos adversos decorrentes do seu uso indiscriminado. Em todo o mundo há uma preocupação sócio governamental envolvendo o uso abusivo de EAA dentro e fora do cenário esportivo (10), uma vez que altas doses de EAA estão associadas a diversos efeitos prejudiciais à saúde física e psíquica (11), tais como alterações na função da tireóide (12) do sistema cardiovascular (13), embolia pulmonar (14) e alterações de humor (15).

Entre os EAA disponíveis no mercado, o decanoato de nandrolona e o cipionato de testosterona (comercialmente conhecidos como deca-durabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup>, respectivamente) estão entre os mais utilizados por via intramuscular (16, 17). Deca-durabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup> são indicados para tratamento clínico de diversas doenças, especialmente devido à ação anabolizante. Assim, deca-durabolin<sup>®</sup> que estimula o crescimento e a resistência celular (18) pode ser utilizado como coadjuvante em terapias específicas e medidas dietéticas em várias condições caracterizadas por um balanço negativo de nitrogênio, no tratamento da osteoporose e do carcinoma mamário (19). Estudos têm demonstrado resultados satisfatórios do uso de cipionato de testosterona no tratamento de disfunção erétil decorrente da insuficiência renal (20) e reposição hormonal em homens com hipogonadismo (21).

O uso indiscriminado destas drogas pode, no entanto, estar associado a diversas disfunções orgânicas. Em modelos animais a administração crônica de decanoato de nandrolona induziu alteração na função da tireóide (22), no metabolismo da dopamina (23),

redução da capacidade reprodutiva (24) e fibrose hepática (25). Ação genotóxica desta droga tanto em animais (26) quanto em humanos tem sido descrita (27). Em terapia de longo prazo ou com altas dosagens cipionato de testosterona pode causar necrose hepática, leucopenia e púrpura hepática (28). Perez et al. demonstraram que ratas-de-deserto (*Meriones unguiculatus*) grávidas expostas a cipionato de testosterona tiveram filhotes com alterações na próstata, como proliferação do epitélio, lúmen reduzido e estroma intensamente remodelado indicativo, em alguns casos, de neoplasia intra-epitelial prostática (29).

Deste modo, a exposição crônica e/ou em dose supra clínica de nandrolona e cipionato de testosterona pode estar relacionada à carcinogênese, uma vez que o câncer é uma doença decorrente de alterações em genes envolvidos no reparo da DNA, controle da proliferação e diferenciação celular. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico do decanoato de nandrolona e do cipionato de testosterona com uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongo.

## Material e Métodos

### *Substâncias químicas*

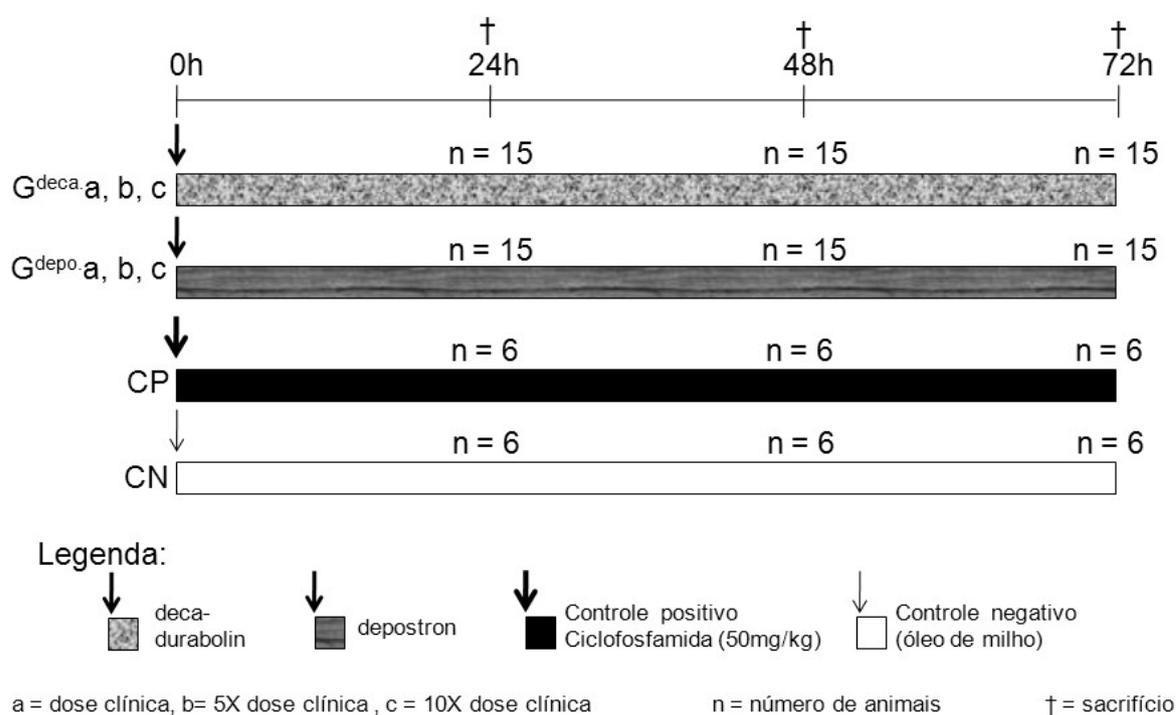
O decanoato de nandrolona (deca-durabolin<sup>®</sup>) e o ciponato de testosterona (deposteron<sup>®</sup>) foram obtidos, respectivamente, dos laboratórios farmacêuticos Organon do Brasil e EMS S/A. A Ciclofosfamida (Enduxan) foi usada como controle positivo, na dose de 50 mg/Kg, e o óleo de milho como controle negativo e veículo de diluição das drogas.

### *Animais*

Os experimentos foram realizados em camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com seis a oito semanas de idade obtidos no Biotério de Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brasil. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, forradas com maravalha autoclavada, em ambiente com temperatura de 22°C ± 2°, umidade em torno de 60%, ciclo de luz de 12h claro/escuro, recebendo ração (LABINA) e água sem restrição.

### *Delineamento experimental*

Os animais foram divididos em seis grupos (quinze animais por grupo) de acordo com as drogas e as concentrações a serem testadas. Três grupos foram tratados com deca-durabolin<sup>®</sup> nas concentrações de 0,075 mg/ml (G1-DC<sup>deca</sup>) correspondendo à dose clínica de acordo com a indicação de fabricante; 0,375 mg/ml à dose clínica concentrada 5X (G2-DC5X<sup>deca</sup>) e 0,75 mg/ml à dose clínica concentrada 10X (G3-DC10X<sup>deca</sup>). O mesmo método foi adotado para o tratamento dos outros três grupos que receberam deposteron<sup>®</sup> também em três diferentes concentrações: 0,3 mg/ml (G4-DC<sup>depo</sup>) correspondendo à dose clínica; 1,5 mg/ml (G5-DC5X<sup>depo</sup>) à dose clínica concentrada 5X e 3,0 mg/ml (G6-DC10X<sup>depo</sup>) à dose clínica concentrada 10X. Os animais destes grupos receberam dose única da droga, via intramuscular (0,1ml/10g de peso corporal). O sacrifício, por deslocamento cervical, ocorreu 24h, 48h e 72h após o tratamento. Um grupo controle positivo (CP) de seis animais para cada grupo de exposição à droga foi tratado com ciclofosfamida (50mg/kg) e outro, também de seis animais, utilizado como controle negativo (CN) foi tratado com veículo de diluição da droga (óleo de milho). Ambos os grupos controle foram também sacrificados 24, 48 e 72h após tratamento (Figura 1). De acordo com a legislação brasileira (Resolução Normativa CONEP 04/97) o estudo foi aprovado Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (CEUA/UEFS).



**Fig. 1.** Delineamento experimental

### *Teste de micronúcleo*

Imediatamente após o sacrifício os fêmures foram removidos e, com auxílio de uma seringa descartável contendo 0,5ml de soro bovino fetal, a medula óssea foi transferida para um tubo de centrifuga contendo 2ml de soro bovino fetal. Este material foi homogeneizado com uso de pipeta Pasteur e centrifugado a 1000rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente homogeneizado e centrifugado. Após novo processo de homogeneização, uma gota da suspensão de células foi colocada em lâmina estéril para microscopia (previamente codificada) e feito um esfregaço com auxílio de outra lâmina. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente *overnight* e o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. Após secagem à temperatura ambiente, lamínulas foram colocadas com entellan<sup>®</sup>. Para avaliar o potencial clastogênico e/ou aneugênico foram analisados dois mil eritrócitos policromáticos (PCE) por animal e registrada a frequência de PCE's micronucleados (PCEMN). Possíveis efeitos citotóxicos foram investigados pela determinação da relação PCE-NCE (eritrócito normocromático) após análise de duzentos eritrócitos/animal (30). As análises foram realizadas em microscópio de luz com ampliação de 1000X.

*Análise estatística*

A ocorrência de micronúcleo nos grupos foi comparada estatisticamente com uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (31). As comparações entre os grupos, fixando os tempos de exposição, para a relação PCE/NCE, foram realizadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados. Quando o teste resultou significativo ( $p < 0,05$ ), foram realizadas as comparações de interesse entre as médias utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

## Resultados

Os resultados observados da ocorrência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nos diferentes tratamentos e tempos de sacrifício são apresentados nas Tabelas I e II.

**Tabela I.** Ocorrência de micronúcleos em PCE de camundongos Swiss tratados com três doses de deca-durabolin<sup>®</sup> e sacrificados, respectivamente 24h, 48h e 72h após tratamento.

Sacrifício	Tratamento	Total de PCE analisado	Micronúcleo	
			Número	%
24h	DC	30.000	57 <sup>a</sup>	0,19
	DC 5X	30.000	50 <sup>a</sup>	0,17
	DC 10X	30.000	141 <sup>b</sup>	0,47
	CP	36.000	272 <sup>c</sup>	0,76
	CN	36.000	66 <sup>a</sup>	0,18
48h	DC	30.000	82 <sup>a</sup>	0,27
	DC 5X	30.000	74 <sup>a</sup>	0,25
	DC 10X	30.000	188 <sup>b</sup>	0,63
	CP	36.000	428 <sup>c</sup>	1,19
	CN	36.000	71 <sup>a</sup>	0,20
72h	DC	30.000	32 <sup>a</sup>	0,11
	DC 5X	30.000	35 <sup>a</sup>	0,12
	DC 10X	30.000	65 <sup>b</sup>	0,22
	CP	36.000	156 <sup>c</sup>	0,43
	CN	36.000	30 <sup>a</sup>	0,08

(DC) dose clínica: 0,075 mg/ml; (DC 5X) 5x a dose clínica: 0,375 mg/ml; (DC 10X) 10x a dose clínica 0,75 mg/ml; (CP) Controle Positivo; (CN) Controle Negativo;(PCE) eritrócito policromático Letras diferentes na mesma coluna, em cada tempo de sacrifício, os tratamentos diferem significativamente pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros ( $p < 0,05$ ).

**Tabela II.** Ocorrência de micronúcleo em PCE de camundongos Swiss tratados com três doses de deposteron<sup>®</sup> e sacrificados, respectivamente 24h, 48h e 72h após tratamento.

Sacrifício	Tratamento	Total de PCE analisado	Micronúcleo	
			Número	%
24h	DC	30.000	50 <sup>a</sup>	0,17
	DC 5x	30.000	52 <sup>a</sup>	0,17
	DC 10x	30.000	116 <sup>b</sup>	0,39
	CP	36.000	272 <sup>c</sup>	0,76
	CN	36.000	66 <sup>a</sup>	0,18
48h	DC	30.000	75 <sup>a</sup>	0,25
	DC 5x	30.000	70 <sup>a</sup>	0,23
	DC 10x	30.000	196 <sup>b</sup>	0,65
	CP	36.000	428 <sup>c</sup>	1,19
	CN	36.000	71 <sup>a</sup>	0,20
72h	DC	30.000	30 <sup>a</sup>	0,10
	DC 5x	30.000	35 <sup>a</sup>	0,12
	DC 10x	30.000	62 <sup>b</sup>	0,21
	CP	36.000	156 <sup>c</sup>	0,43
	CN	36.000	30 <sup>a</sup>	0,08

(DC) dose clínica: 0,3 mg/ml; (DC 5X) 5x a dose clínica: 1,5 mg/ml; (DC 10X) 10x a dose clínica 3,0 mg/ml; (CP) Controle Positivo; (CN) Controle Negativo;(PCE) eritrócito policromático. Letras diferentes na mesma coluna, em cada tempo de sacrifício, os tratamentos diferem significativamente pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística comparando a ocorrência de micronúcleos entre os grupos revelou que ambas as drogas apresentaram efeito mutagênico na maior concentração testada (10X a dose

clínica) independente do tempo de sacrifício após o tratamento. Animais tratados com as drogas nesta concentração apresentaram maior ocorrência de micronúcleos em relação ao controle negativo e aqueles que receberam dose relativa ao recomendado clinicamente e na concentração 5X. A ocorrência de micronúcleos nestes dois últimos grupos não diferiu da observada no controle negativo. Em todos os tratamentos e tempos de exposição (período entre a aplicação da substância e o sacrifício) a ocorrência de micronúcleos nos animais do controle positivo, que receberam ciclofosfamida, foi significativamente maior.

As médias da relação PCE/NCE submetidas à análise pelo teste Kruskal-Wallis são apresentadas na Tabela III.

**Tabela III.** Relação PCE/NCE em camundongos Swiss após tratamento com três diferentes doses de deca-durabolin<sup>®</sup> ou deposteron<sup>®</sup>, ciclofosfamida e óleo de milho.

Tratamento	PCE/NCE (média±DP)					
	† 24h		† 48h		† 72h	
	deca-durabolin <sup>®</sup>	deposteron <sup>®</sup>	deca-durabolin <sup>®</sup>	deposteron <sup>®</sup>	deca-durabolin <sup>®</sup>	deposteron <sup>®</sup>
DC	1,68±0,06a	1,67±0,05a	1,08±0,09bc	1,09±0,05bc	1,66±0,05a	1,66±0,05a
DC 5X	1,63±0,05a	1,65±0,05a	1,30±0,16ab	1,37±0,11ab	1,64±0,08a	1,64±0,08a
DC 10X	0,91±0,04b	0,91±0,03b	0,91±0,11cd	0,91±0,11cd	1,63±0,06a	1,61±0,07a
CP	0,89±0,04b	0,89±0,04b	0,80±0,08d	0,80±0,08d	0,94±0,05b	0,94±0,05b
CN	1,65±0,07a	1,65±0,07a	1,50±0,15a	1,50±0,15a	1,70±0,08a	1,70±0,08a

(DC) Dose clínica; (DC 5X) Dose clínica concentrada 5X; (DC 10X) Dose clínica concentrada 10X; (CP) Controle Positivo; (CN) Controle Negativo; † = Sacrifício; PCE = eritrócito policromático; NCE = eritrócitonormocromático. Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pela Prova de Kruskal-Wallis, para cada dose aplicada ( $p < 0,05$ ).

Os resultados mostram que os grupos expostos a deca-durabolin<sup>®</sup> ou deposteron<sup>®</sup> nas doses clínica e 5X não diferiram estatisticamente do controle negativo, em todos os tempos de exposição. O mesmo foi observado para os animais do grupo DC 10X, quando foram sacrificados 72 horas após o tratamento. Entretanto, para os grupos tratados com esta dose, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas houve diferença estatística quando comparados aos seus respectivos grupos controle negativo. Nestas condições, animais expostos às drogas apresentaram valores semelhantes, na relação PCE/NCE, àqueles observados nos grupos tratados com a ciclofosfamida, na dose de 50 mg/Kg (controle positivo).

## Discussão

O teste de micronúcleo se constitui em um método eficaz para identificação de danos cromossômicos decorrentes da ação de agentes físicos ou químicos sobre o DNA, e por isso tem sido extensivamente utilizado (32, 33). Desenvolvido com material de medula óssea de roedores é um teste aceito pelas agências internacionais e institucionais governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (34).

Neste estudo a ocorrência de micronúcleo significativamente maior observada apenas nos grupos de animais tratados com deca-durabolin<sup>®</sup> ou deposteron<sup>®</sup> em concentração 10X a recomendada pelo fabricante indica que estes hormônios têm ação genotóxica dependendo da concentração. Efeito da concentração de deposteron<sup>®</sup> na indução de danos genéticos não é relatado na literatura, entretanto resultados similares sobre avaliação genotóxica de deca-durabolin<sup>®</sup> foram descritos por Oliveira et al. (35) e Carmo et al. (26) e apontam para o prejuízo à saúde pública causado pelo uso indiscriminado de substâncias desta natureza, disseminado em diversos níveis sociais, incluindo esportistas profissionais, ou não, (36) e praticantes de musculação (9).

O mecanismo de ação destas substâncias na indução de danos genéticos não é bem compreendido, entretanto, segundo Torres-Bugarin et al. (37), que identificaram maior ocorrência de micronúcleos em células da mucosa oral de fisiculturistas usuários de esteróides anabólicos androgênicos, hormônios esteróides quando administrados em doses elevadas podem saturar os receptores celulares. O excesso de hormônio no citoplasma pode ser convertido pelo complexo de enzimas de aromatase em estrógenos (38) que podem ter efeito genotóxico com potencial carcinogênico (39). Além disso, segundo Joosten et al. (40) diversos estrógenos estão associados a alterações genéticas, tais como mutação de ponto, quebras cromossômicas e aneuploidia. Liehr (41) constatou que o 17 $\beta$ -estradiol estimula a proliferação celular e quando metabolizado é convertido em compostos que podem causar danos ao DNA. A genotoxicidade do 17- $\beta$ - estradiol avaliada com uso do teste de micronúcleo foi também demonstrada por outros estudos (42-44). Há, no entanto, evidências de ação mutagênica indireta pela formação geração de radicais livres (45) e adutos de DNA (46).

Com relação aos efeitos citotóxicos, revelados pela análise da relação PCE/NCE, pode-se observar que o deca-durabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup>, na concentração mais alta e nos grupos expostos à droga por 24 e 48 horas, induziu atraso do ciclo celular, com valores

semelhantes àqueles demonstrados pelos animais tratados com a ciclofosfamida, droga reconhecidamente citotóxica para a medula óssea de camundongos.

Diversos autores tem relatado efeito citotóxico de EAA (47-49). Além disso, segundo Perez et al. (29) os esteróides anabólicos são reconhecidamente indutores de proliferação tumoral em vários órgãos e em múltiplas espécies, incluindo seres humanos.

A análise dos resultados deste estudo permite concluir que decanoato de nandrolona e cipionato de testosterona nas formas comerciais conhecidas respectivamente como decadurabolin<sup>®</sup> e deposteron<sup>®</sup>, quando administrados em concentração superior (10X) à indicada pelo fabricante, induzem dano cromossômico e efeito citotóxico em células da medula óssea de camundongo. Considerando que estes são eventos importantes na iniciação e promoção do câncer é, portanto, altamente recomendável que EAA sejam utilizados exclusivamente no tratamento de doenças e sob orientação médica.

## Referências

1. Mottram, D. R. and George, A. J. (2000) Anabolic steroids. *Bailliere Clin. Endoc.*, **14**, 55-69.
2. Shahidi, N.T. (2001) A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.*, **23**, 1355-90.
3. Bhasin, S., Storer, T. W., Berman, N., Yarasheski, K. E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W. P., Bunnell, T. J. and Casaburi, R. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **82**, 407-13.
4. Schroor, E. J., Weissenbruch, M. M., Knibbe, P. and Waal, H. A.D. (1995) The effect of prolonged administration of an anabolic steroid (oxandrolone) on growth in boys with constitutionally delayed growth and puberty. *Eur. J. Pediatr.*, **154**, 953-7.
5. Ebeling, P. and Koivisto, V. A. (1994) Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet*, **343**, 1479-81.
6. English, K. M., Steeds, R. P., Jones, T. H., Diver, M. J. and Channer, K. S. (2000) Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, **102**, 1906-11.
7. Wade, N. Anabolic steroids: doctors denounce them, but athletes aren't listening. (1972) *Science*, **176**, 1399-403.
8. Yersalis, C. E., Kennedy, N.J., Kopstein, A.N. and Bahrke, M. S. (1993) Anabolic androgenic steroid use in the United States. *J. Am. Med. Assoc.*, **270**:1217-21.
9. Iriart, J. A. B. and Andrade, T. M. (2002) Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, **18**, 1379-87.
10. Silva, P. R. P., Danielski, R. and Czepielewski, M. A. (2002) Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev. Bras. Med. Esporte*, **8**, 235-43.
11. Brower, K. J., Eliopoulos, G. A., Blow, F. C., Catlin, D.H. and Beresford, T. P. (1990) Evidence for physical and psychological dependence on anabolic androgenic steroids in eight weight lifters. *Am. J. Psychiatry*, **147**:510-2.
12. Fortunato, R. S., Rosenthal, D. and Carvalho, D. P. (2007) Abuso de esteróides anabolizantes e seu impacto sobre a função tireóidea. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1417-24.
13. Kasikcioglu, E., Oflaz, H., Arslan, A., Topcu, B., Kasikcioglu, H. A., Umman, B., Bugra, Z., and Kayserilioglu, A. (2007) Aortic elastic properties in athletes using anabolic-androgenic steroids. *Int. J. Cardiol.*, **114**, 132-4.

14. Liljeqvist, S., Helldén, A., Bergman, U. and Söderberg M. (2008) Pulmonary embolism associated with the use of anabolic steroids. *Eur. J. Intern. Med.*, **19**, 214-5.
15. Lindqvist, A. S., Johansson-Steensland, P., Nyberg, F. and Fahlke, C. (2002) Anabolic androgenic steroids affects competitive behaviour, behavioural response to ethanol and brain serotonin levels. *Behav. Brain Res.*, **133**, 21-9.
16. Boff, S. R. (2008) Efeitos colaterais dos esteróides anabolizantes sintéticos. *Rev. Bras. Ci. e Mov.*, **16**, 123-7.
17. National Institute on Drug Abuse (NIDA). *ResearchReports: AnabolicSteroid Abuse*. (2006) Available at <http://www.drugabuse.gov/>
18. Perez, R. R., Silva, M. A. M. L., Varzim, F. L. S. B., Oliveira, S. B. and Hucke, E. E. T. S. (2005) A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin<sup>®</sup>) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin<sup>®</sup>). *Ciênc. Rural*, **35**, 589-95.
19. Deca-durabolin<sup>®</sup> (decanoato de nadrolona): solution for intramuscular injection. Technical manager: Elizabeth M. Oliveira. São Paulo: Organon do Brasil Indústria e Comércio Ltda. Drug labeling.
20. Chatterjee, R., Wood, S., McGarrigle, H. H., Lees, W. R., Ralph, D. J. and Neild, G. H. (2004) A novel therapy with testosterone and sildenafil for erectile dysfunction in patients on renal dialysis or after renal transplantation. *J. Fam. Plan. Reprod. H.*, **30**, 88-90.
21. Snyder, P. J. and Lawrence, D.A. (1980) Treatment of male hypogonadism with testosterone enanthate. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**,1335-9.
22. Fortunato, R. S., Marassi, M. P., Chaves, E. A., Nascimento, J. H., Rosenthal, D. and Carvalho, D. P. (2006) Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **38**, 256-61.
23. Birgner, C., Kindlundh-Hogberg, A. M. S., Nyberg, F. and Bergstroma, L. (2007) Altered extracellular levels of DOPAC and HVA in the rat nucleus accumbens shell in response to sub-chronic nandrolone administration and a subsequent amphetamine challenge. *Neurosci. Lett.*, **412**, 168-72.
24. Far, H. R. M., Agren. G., Lindqvist, A., Marmendal, M., Fahlke, C. and Thiblin, I. (2007) Administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate to female rats causes alterations in the morphology of their uterus and a reduction in reproductive capacity. *Eur. J. Obstet. Gyn. R. B.*, **131**,189-97.

25. Vieira, R. P., França, R. F., Damaceno-Rodrigues, N. R., Dolhnikoff, M., Caldini, É. G., Carvalho, C. R. F. and Ribeiro, W. (2008) Dose-dependent hepatic response to subchronic administration of nandrolone decanoate. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **40**, 842-7.
26. Carmo, C. A., Gonçalves, Á. L. M., Salvadori, D. M. F. and Maistro, E. L. (2011) Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J. Appl. Toxicol.*, Article first published online.
27. Martins, R. A., Gomes, G. A. S., Aguiar Jr, O., Medalha, C. C. and Ribeiro, D. A. (2010) Chromosome damage and cytotoxicity in oral mucosa cells after 2 months of exposure to anabolic steroids (deca-durabolin and winstrol) in weight lifting. *Steroids*, **75**, 952-5.
28. Deposteron<sup>®</sup> (cipionato de testosterona): solution for intramuscular injection. Technical manager: Maria Geisa P. de Lima e Silva. São Paulo: EMS S/A. Drug labeling
29. Perez, A. P. S., Biancardi, M. F., Vilamaior, P. S. L., Góes, R. M., Santos, F. C.A. and Taboga, S. R. (2012) Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during pre natal life on the prostatic tissue of adult gerbils. *Microsc. Res. Tech.*, Article first published online.
30. Gollapudi, B. B. and McFadden, L. G. (1995) Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erithrocyte ratio in the boné marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*, **347**, 97-9.
31. Bragança-Pereira, C. A. (1991) Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R., Maontelesone Neto, R. (eds), *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e criterios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, pp. 113-21.
32. Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R., Maontelesone Neto, R. (1991), *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e criterios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo.
33. Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F. and Marques, E. K. (2003) *Mutagênese ambiental*, ULBRA, Rio Grande do Sul.
34. Choy, W.N. (2001) Regulatory Genetic Toxicology tests. In Choy, W. N. (ed), *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 93-114.
35. Oliveira, D. G. (2000) Efeito clastogênico do Deca-Durabolin em ratos, mediante a análise do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. *Plural*, **1**, 91-100.
36. Tentori, L. and Graziani, G. (2007) Doping with growth hormone/IGF-1, anabolic steroids or erythropoietin: is there a cancer risk? *Pharmacol. Res.*, **55**, 359-69.

37. Torres - Bugarín, O., Covarrubias - Bugarín, R., Zamora - Perez, A. L., Torres - Mendoza, B. M. G., García - Ulloa, M. and Martínez - Sandoval, F. G. (2007) Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *Brit. J. Sport Med.*, **41**, 592-6.
38. Fishman, J. (1982) Biochemical mechanism of aromatization. *Cancer Res.*, **42**, 3277-80.
39. Mense S. M. (2008) Estrogen-induced breast cancer: Alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **232**, 78-85.
40. Joosten, H. F. P. (2004) Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicol.Lett.*, **151**, 113-34.
41. Liehr, J. G. (2000) Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr. Rev.*, **21**, 40-5.
42. Fischer, W. H., Keiwan, A., Schmitt, E. and Stopper, H. (2001) Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, **16**, 209-12.
43. Stopper, H., Schmitt, E., Gregor, C., Mueller, S. O. and Fischer, W. H. (2003) Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*, **18**, 243-7.
44. Kayani, M. A. and Parry, J. M. (2008) The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutat.Res.*, **651**, 40-5.
45. Rubin. R. P. (2004) Adrenocortical hormones and drugs affecting the adrenal cortex. In Craig, C. R. and Stitzel, R. E. (eds), *Modern pharmacology with clinical applications*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 686-703.
46. Seraj, M. J., Umemoto, A., Tanaka, M., Kajikawa, A., Hamada, K. and Monden, Y. (1996) DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. *Mutat. Res.*, **370**, 49-59.
47. Clark, A. S., Mitre, M.C. and Brinck-Johnsen, T. (1995) Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res.*, **679**, 64-71.
48. Zaugg, M., Jamali, N. Z., Lucchinetti, E., Xu, W., Alam, M., Shafiq, S. A. and Siddiqui, M. A. (2001) Anabolic androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J. Cell Physiol.*, **187**, 90-5.
49. Swenberg J. A. (1993) Cell proliferation and chemical carcinogenesis: conferences summary and future directions. *Environ. Health Perspect.*, **101**, 153-8.

## 4 CAPÍTULO 2

### Efeito genotóxico e citotóxico do esteroide anabolizante sintético durateston<sup>®2</sup>

#### RESUMO

A relação entre uso indiscriminado de Esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA) e câncer tem motivado pesquisadores investigar a ação mutagênica destas substâncias, uma vez que o câncer é uma doença decorrente de alterações em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA, controle da proliferação e diferenciação celular. Assim, este estudo objetivou avaliar o potencial genotóxico do durateston<sup>®</sup> (esteroide sintético que combina propionato, fempropionato, isocaproato e decanoato de testosterona) com uso do Teste de Micronúcleo em medula óssea de roedor. Camundongos machos Swiss com seis a oito semanas de idade receberam injeções intramuscular de durateston<sup>®</sup> em três concentrações. Um grupo controle negativo foi tratado com óleo de milho (veículo de diluição da droga) e outro com ciclofosfamida (controle positivo). Os animais foram sacrificados 24h, 48h e 72h após tratamento e imediatamente precedeu-se à retirada da medula óssea e processamento para computo da ocorrência de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (PCE). Duzentos eritrócitos/animal foram analisados para determinação da relação PCE-NCE (eritrócito normocromático) e inferir sobre efeitos citotóxicos. Os animais tratados com durateston<sup>®</sup> em maior concentração (10X a dose clínica recomendada pelo fabricante) apresentaram significativamente mais micronúcleos em relação aos demais grupos, exceto o controle positivo. A quantidade de micronúcleo nos outros grupos tratados com o EAA não diferiu em relação ao controle negativo, nem entre eles. A maior concentração também induziu redução na relação PCE/NCE indicando efeito citotóxico. A análise destes resultados permite concluir que em camundongos durateston<sup>®</sup> tem efeito genotóxico e citotóxico dependendo da concentração em que é administrado.

Palavras-chave: durateston<sup>®</sup>, citotoxicidade, genotoxicidade, micronúcleo.

---

<sup>2</sup> Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico Steroids (anexo II)

O durateston<sup>®</sup> é um esteróide anabolizante androgênico (EAA) sintético que resulta de uma combinação de ésteres de testosterona de diferentes meias-vidas (propionato, fempropionato, isocaproato, decanoato de testosterona) proporcionando maior duração de níveis terapêuticos [1]. Produtos desta natureza são frequentemente utilizados no tratamento de hipogonadismo [2], retardo de crescimento e puberdade [3], câncer de mama [4] e doenças cardiovasculares [5].

O uso de EAA, no entanto, não está atualmente restrito ao tratamento clínico. Devido a significativa atividade anabólica e reduzida androgenicidade [6] são largamente utilizados por atletas recreacionais [7] e praticantes de musculação [8]. Em diversos países tem sido registrado o aumento no uso de EAA por estes indivíduos que objetivam perda de gordura corporal, ganho de força e massa muscular [9-12].

Em diversos estudos são descritos prejuízos à saúde psíquica e física decorrentes desta modalidade de uso dos EAA. Há evidências de que o uso indiscriminado destas substâncias pode causar transtornos de humor [13], síndromes de dependência [14-15], embolia pulmonar [16], alteração neuroendócrina [17] e cardiovascular [18]. Além disso, a associação entre a exposição a EAA e desenvolvimento de tumores de próstata e testículo também é relatada na literatura [19-20]. Estes resultados apontam desse modo para a possível ação genotóxica dos EAA, uma vez que o câncer é uma doença genética decorrente de alterações em genes envolvidos na diferenciação e no controle da proliferação celular, nos mecanismo de reparo do DNA e nas vias de apoptose. Neste contexto, o uso de anabolizantes sintéticos tem se tornado nas últimas décadas um problema de saúde pública e em todo o mundo uma preocupação sócio governamental [21].

Entre os EAA disponíveis no mercado brasileiro, durateston<sup>®</sup> é um dos mais utilizados por via intramuscular entre os praticantes de musculação [22], sendo clinicamente indicado em terapia de reposição da testosterona em distúrbios hipogonadais no homem, certos tipos de infertilidade originária de distúrbios da espermatogênese e na osteoporose de origem deficitária de andrógenos [23]. Estudos têm demonstrado resultados satisfatórios do uso de durateston<sup>®</sup> no tratamento da síndrome de Klinefelter associada a lúpus [24] e “andropausa” [1].

Efeitos prejudiciais à saúde do uso de durateston<sup>®</sup> tem registro escasso na literatura. Segundo o fabricante não se espera a ocorrência de sintomas tóxicos nas doses recomendadas e não há dados referentes aos sintomas ou tratamento para superdosagem aguda [23]. Entretanto Sakurai et al. demonstraram que uma única injeção intraperitoneal de propionato de testosterona, um dos componentes da formulação de durateston<sup>®</sup>, induziu formação de

ovário policístico e alterações na metáfase da primeira e da segunda divisão meiótica em células germinativas [25]. Em ratos albinos (*Rattus norvegicus*) injeções intramusculares de durateston<sup>®</sup> causou em células dos testículos alterações nucleares que incluíam núcleos apoptóticos e com cromatina condensada na margem [26].

Neste contexto, considerando que o abuso intencional de drogas anabolizantes androgênicos por atletas tem aumentado rapidamente em muitos países e as investigações são necessários para estudar os efeitos adversos destas drogas [26], o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico do durateston<sup>®</sup> com uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongo.

## 1. Material e Métodos

### 1.1. Substâncias químicas

O durateston<sup>®</sup> foi obtido do laboratório farmacêutico Organon do Brasil. Ciclofosfamida (Enxudan), na dose de 50mg/kg, foi usada como substância controle positivo. Óleo de milho foi utilizado como controle negativo e veículo de diluição do anabolizante.

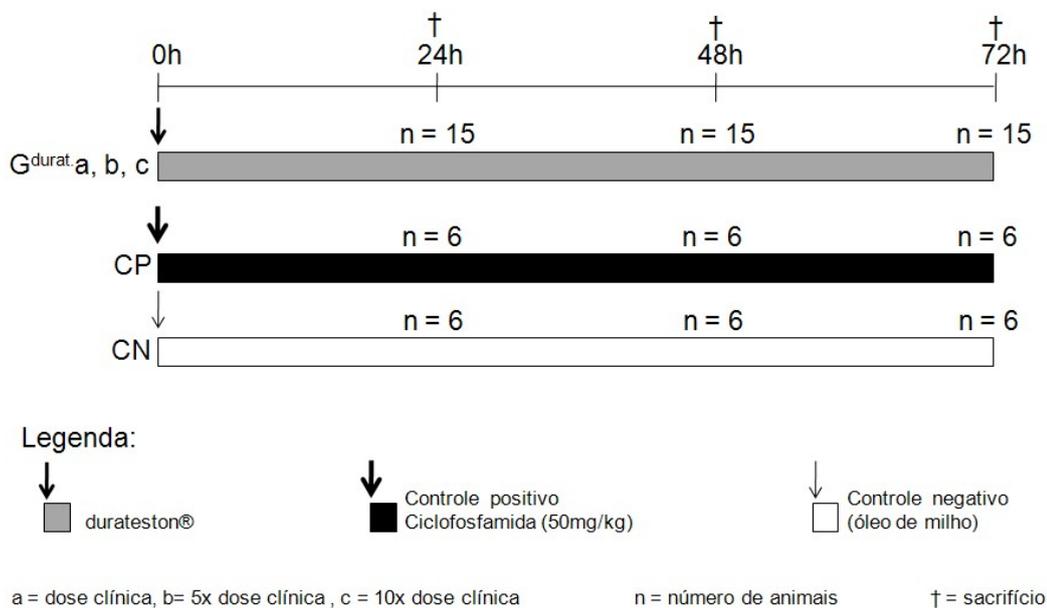
### 1.2. Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com seis a oito semanas de idade obtidos no Biotério de Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brasil. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, forradas com maravalha autoclavada, em ambiente com temperatura de 22°C ± 2, umidade em torno de 60%, ciclo de luz de 12h claro/escuro, recebendo ração (LABINA) e água sem restrição.

### 1.3. Delineamento experimental

Os animais foram divididos em três grupos (quinze animais por grupo), de acordo com a concentração da droga a ser testada: (1) dose clínica (DC) de acordo com a indicação de fabricante (0,045 mg/ml de propionato de testosterona + 0,09 mg/ml de fempropionato de testosterona + 0,09 mg/ml de isocaproato de testosterona + 0,15 mg/ml de decanoato de testosterona); (2) dose clínica concentrada 5X (DC 5X), o que corresponde a 0,225 mg/ml de propionato de testosterona + 0,45 mg/ml de fempropionato de testosterona + 0,45 mg/ml de isocaproato de testosterona + 0,75 mg/ml de decanoato de testosterona e (3) dose clínica concentrada 10X (DC 10X) correspondendo a 0,45 mg/ml de propionato de testosterona + 0,9 mg/ml de fempropionato de testosterona + 0,9 mg/ml de isocaproato de testosterona + 1,5 mg/ml de decanoato de testosterona. Injeções intramuscular (0,1ml/10g de peso corporal) de cada dose testada de durateston<sup>®</sup> foram administradas nos animais destes grupos (G<sup>durat</sup>). O sacrifício, por deslocamento cervical, ocorreu 24h, 48h e 72h após o tratamento. Um grupo controle positivo (CP) de seis animais para cada grupo de exposição à droga foi tratado com ciclofosfamida (50mg/kg) e outro, também de seis animais, utilizado como controle negativo (CN) foi tratado com veículo de diluição da droga (óleo de milho). Ambos os grupos controle foram também sacrificados 24h, 48h e 72h. O delineamento experimental do estudo é

apresentado na Fig.1. Em atendimento à legislação brasileira (Resolução Normativa CONEP 04/97) o estudo foi aprovado Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (CEUA/UEFS).



**Fig. 1.** Delineamento experimental

#### 1.4. Teste de micronúcleo

Imediatamente após o sacrifício, os fêmures foram removidos e com auxílio de uma seringa descartável contendo 0,5ml de soro bovino fetal a medula óssea foi transferida para um tubo de centrifuga contendo 2ml de soro bovino fetal. Este material foi homogeneizado com uso de pipeta Pasteur e centrifugado a 1000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente homogeneizado e centrifugado. Após novo processo de homogeneização, uma gota da suspensão de células foi colocada em lâmina para microscopia estéril (previamente codificada) e feito um esfregaço com auxílio de outra lâmina. As lâminas foram secadas à temperatura ambiente *overnight* e o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. Após secagem à temperatura ambiente, lamínulas foram colocadas com entellan®. Para avaliar o potencial clastogênico/ou aneugênico do durateston® a ocorrência de micronúcleo em dois mil eritrócitos policromáticos (PCE) por animal foi observada. Possíveis efeitos citotóxicos foram investigados pela determinação da relação PCE-NCE (eritrócito normocromático) após análise de duzentos eritrócitos/animal [27]. As análises foram realizadas analisadas em microscópio de luz com ampliação de 1000X.

### *1.5. Análise estatística*

A ocorrência de micronúcleo nos grupos foi comparada estatisticamente com uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros [28]. As comparações entre os grupos, fixando os tempos de exposição, para a relação PCE/NCE, foram realizadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados. Quando o teste resultou significativo ( $p < 0,05$ ), foram realizadas as comparações de interesse entre as médias utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

## 2. Resultados

Os resultados observados da ocorrência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nos diferentes tratamentos e tempos de sacrifício estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1**

Ocorrência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de camundongos swiss tratados com três doses de durateston<sup>®</sup> e sacrificados, respectivamente 24h, 48h e 72h após tratamento.

Sacrifício	Tratamento	Total de PCE analisado	Micronúcleo	
			Número	%
24h	DC	30.000	54 <sup>a</sup>	0,18
	DC 5x	30.000	48 <sup>a</sup>	0,16
	DC 10x	30.000	167 <sup>b</sup>	0,56
	CP	36.000	272 <sup>c</sup>	0,76
	CN	36.000	66 <sup>a</sup>	0,18
48h	DC	30.000	89 <sup>a</sup>	0,30
	DC 5x	30.000	77 <sup>a</sup>	0,26
	DC 10x	30.000	189 <sup>b</sup>	0,63
	CP	36.000	428 <sup>c</sup>	1,19
	CN	36.000	71 <sup>a</sup>	0,20
72h	DC	30.000	33 <sup>a</sup>	0,11
	DC 5x	30.000	32 <sup>a</sup>	0,11
	DC 10x	30.000	55 <sup>b</sup>	0,18
	CP	36.000	156 <sup>c</sup>	0,43
	CN	36.000	30 <sup>a</sup>	0,08

(DC) dose clínica; (DC 5X) 5x a dose clínica; (DC 10X) 10x a dose clínica; (CP) Controle Positivo; (CN) Controle Negativo; (PCE) eritrócito policromático Letras diferentes na mesma coluna, em cada tempo de sacrifício, os tratamentos diferem significativamente pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística comparando a ocorrência de micronúcleo entre os grupos revelou que o durateston<sup>®</sup> apresentou efeito mutagênico na maior concentração testada (10X a dose clínica) independente do tempo de sacrifício após o tratamento. Animais tratados com a droga nesta concentração apresentaram maior ocorrência de micronúcleo em relação ao controle negativo e aqueles que receberam dose relativa ao recomendado clinicamente e esta concentrada 5X. A ocorrência de micronúcleo nestes dois últimos grupos não diferiu da identificada entre os controles negativos. Em todos os tratamentos e tempos de exposição (período entre a aplicação da substância e o sacrifício) a ocorrência de micronúcleo nos animais do controle positivo, que receberam ciclofosfamida, foi significativamente maior.

As médias da relação PCE-NCE submetidas à análise pelo teste de Kruskal-Wallis são apresentadas na Tabela 2. A relação PCE-NCE identificada para os animais tratados com

durateston<sup>®</sup> nas doses clínica e 5X não diferiu da observada nos animais que compunham o controle negativo, em todos os tempos de exposição. Resultado similar foi observado para os animais tratados com durateston<sup>®</sup> em concentração 10X a dose clínica (DC 10X) e sacrificados 72 horas após o tratamento. Entretanto, para os grupos tratados com esta dose e sacrificados após 24 e 48 horas os valores de PCE-NCE não diferiram daqueles observados nos grupos tratados com a ciclofosfamida (controle positivo).

**Tabela 2**

Relação PCE/NCE em camundongos Swiss após tratamento com três diferentes doses de durateston<sup>®</sup>, ciclofosfamida e óleo de milho.

Tratamento	PCE/NCE (média ± DP)		
	† 24h	† 48h	† 72h
DC	1,66 ± 0,05 <sup>a</sup> *	1,10 ± 0,05 <sup>bc</sup> *	1,66 ± 0,05 <sup>ab</sup> *
DC 5x	1,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,11 <sup>ab</sup>	1,58 ± 0,06 <sup>c</sup>
DC 10x	0,91 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,11 <sup>cd</sup>	1,64 ± 0,08 <sup>bc</sup>
CP	0,89 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,08 <sup>d</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>d</sup>
CN	1,65 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,08 <sup>a</sup>

(DC) Dose clínica; (DC 5X) Dose clínica concentrada 5X; (DC 10X) Dose clínica concentrada 10X; (CP) Controle Positivo; (CN) Controle Negativo; † = Sacrifício; PCE = eritrócito policromático; NCE = eritrócito normocromático. Letras diferentes na mesma coluna, os tratamentos diferem significativamente pela Prova de Kruskal-Wallis, para cada dose aplicada (p < 0,05).

### 3. Discussão

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão governamental vinculado ao Ministério da Saúde do Brasil, adverte que os hormônios androgênicos sintéticos não são indicados para estimular o desenvolvimento muscular ou melhorar a capacidade física em indivíduos saudáveis [29]. Entretanto, o uso destas substâncias por estes indivíduos é cada vez mais frequente [7-12], fato que tornou a comercialização de medicamentos desta natureza uma prática, além de condicionada à prescrição médica, mais rigorosamente controlada.

As medidas governamentais para controlar o comércio de EAA decorrem dos diversos efeitos prejudiciais à saúde, inclusive o risco de câncer, amplamente registrados na literatura [13-20]. A ação dos EAA na indução de danos cromossômicos e citotóxicos não tem, no entanto, sido investigada com frequência [30], razão esta que suscitou o presente estudo desenvolvido para avaliar o potencial genotóxico do durateston<sup>®</sup>, utilizando para tal o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores, uma vez que este é aceito pelas agências internacionais e institucionais governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial [31].

Micronúcleos são fragmentos de cromossomo ou cromossomos inteiros que devido a quebra cromossômica ou disfunção no fuso não migram para os pólos da célula durante a anáfase e, portanto não são incorporados aos núcleos das células filhas na telófase [32]. Desse modo, micronúcleos são marcadores biológicos de danos ao material genético.

Neste estudo o EAA durateston<sup>®</sup> induziu danos cromossômicos, traduzidos na maior ocorrência de micronúcleo, quando administrado em concentração 10X a recomendada pelo fabricante, enquanto animais tratados com a droga de acordo com a dose indicada ou concentrada 5X não apresentaram aumento na frequência de micronúcleo. Estes resultados evidenciam o potencial genotóxico do durateston<sup>®</sup>, revelado na dependência da concentração utilizada e apontam para o risco à saúde pública, uma vez que o uso de superdosagens é frequente entre praticantes de musculação [33-35]. Efeito da concentração de durateston<sup>®</sup> na indução de danos genéticos não é relatado na literatura, entretanto Oliveira et al. [36] e Carmo et al. [37] também descreveram este efeito em estudos objetivando avaliar o potencial genotóxico de deca-durabolin<sup>®</sup>, um outro EAA largamente utilizado por praticantes de musculação [38].

Carmo (2009) aplicou por via intradérmica três diferentes doses de deca-durabolin<sup>®</sup> (1,0; 2,5 e 5,0 mg/kg peso corporal) em três grupos de camundongos objetivando avaliar o

efeito mutagênicos da droga. O efeito da concentração na indução de micronúcleo também foi observado neste estudo, uma vez que este autor identificou maior frequência de micronúcleo nas duas maiores doses testadas evidenciando, deste modo, o efeito clastogênico e/ou aneugênicos dessa droga.

Os resultados deste estudo sugerem que o potencial mutagênico da deca-durabolin® é dependente da concentração da droga, corroborando aqueles descritos por Oliveira et al. (2000). Estes autores identificaram que o aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos é dependente da dose e do tempo de exposição do animal à droga e sugerem que quanto maior a dose, maior a frequência de células micronucleadas.

A genotoxicidade dos EAA não é ainda bem compreendida e diversos mecanismos têm sido sugeridos para explicar a ação destes compostos em induzir lesões no DNA. Derivados da testosterona podem ser convertidos em 17 $\beta$ -estradiol, um esteróide potencialmente mutagênico [39-41] e carcinogênico [42, 43]. Adicionalmente à produção do 17 $\beta$ -estradiol, etapa comum a todos os EAA, outros metabolitos com potencial carcinogênico poderiam ser formados no processamento dos EAA [30]. O processo metabólico dos EAA pode também produzir radicais livres [30], moléculas químicas instáveis e altamente reativas associadas à indução de danos genéticos [44]. Seraj et al [45] mostraram que derivados da testosterona podem formar adutos de DNA, o que induz alteração imediata na molécula [43]. A indução de micronúcleos em animais expostos à maior concentração de durateston® poderia ser devida à ação isolada ou conjunta desses mecanismos. Segundo Torres-Bugarín et al. [30], a toxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade de hormônios sexuais são o resultado de uma combinação de fatores genéticos e epigenéticos.

A análise da relação PCE/NCE revelou que durateston® quando administrado em concentração 10X à indicada pelo fabricante, é também citotóxico. Ação citotóxica de EAA foi relatada [46, 47], inclusive, como sugerem nossos resultados, com efeito dose-dependente [26, 48], o que provavelmente decorre da natureza tóxica ao ambiente celular de metabolitos formados em seu processamento. A exposição crônica a citotoxinas pode induzir proliferação celular [48], o que aumenta a probabilidade da ocorrência de mutações e acúmulo de células geneticamente danificadas, um importante fator na iniciação do câncer. Deste modo, os esteróides anabólicos são reconhecidamente indutores de proliferação tumoral em vários órgãos e em múltiplas espécies, incluindo seres humanos [26].

Diante do exposto, os resultados deste estudo sugerem que durateston®, quando administrado em concentração superior (10X) à indicada pelo fabricante, induz dano cromossômico e efeito citotóxico em células da medula óssea de camundongo. Considerando

que estes são eventos importantes na iniciação e promoção do câncer é, portanto, altamente recomendável que EAA sejam utilizados exclusivamente no tratamento de doenças e sob orientação médica.

## Referências

- [1] Hohl A, Marques MO, Coral MH, Walz R. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53: 989-95.
- [2] Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski K E, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ, Casaburi, R. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82: 407-13
- [3] Schroor EJ, Weissenbruch MM, Knibbe P, Waal HAD. The effect of prolonged administration of an anabolic steroid (oxandrolone) on grow thin boys with constitutionally delayed growth and puberty. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 953-7.
- [4] Ebeling P, Koivisto VA. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 1994; 343: 1479-81.
- [5] English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2000; 102: 1906-11.
- [6] Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001; 23: 1355-90.
- [7] Yersalis CE, Kennedy NJ, Kopstein AN, Bahrke MS. Anabolic androgenic steroid use in the United States. *JAMA* 1993; 270:1217-21.
- [8] Iriart JAB, Andrade TM. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2002; 18: 1379-87.
- [9] Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 614-20.
- [10] Nilsson S, Baigi A, Marklund B, Fridlund B. The prevalence of the use of the androgenic anabolic steroids by adolescents in a country of Sweden. *Eur J Public Health* 2001; 11: 195-7.
- [11] Rachon D, Pokrywka L, Suchecka-Rachon K. Prevalence and risk factors of anabolic-androgenic steroids (AAS) abuse among adolescents and young adults in Poland. *Soz Praventivmed* 2006; 51: 392-8.
- [12] Iriart, JAB, Chaves JC, Orleans RG. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cad Saúde Pública* 2009; 25: 773-82.

- [13] Lindqvist AS, Johansson-Steensland P, Nyberg F, Fahlke C. Anabolic androgenic steroids affects competitive behaviour, behavioural response to ethanol and brain serotonin levels. *Behav Brain Res* 2002; 133: 21-9.
- [14] Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson J I, Pope HG Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction* 2009; 104: 1966-78.
- [15] Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson J I, Pope HG Jr. Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: emerging evidence and its implications. *Drug Alcohol Depend* 2010; 109: 6-13.
- [16] Liljeqvist S, Helldén A, Bergman U, Söderberg M. Pulmonary embolism associated with the use of anabolic steroids. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 214–5
- [17] Kanayama G, Hudson JI, Pope HG Jr. Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Horm Behav* 2010; 58: 111-21.
- [18] Kasikcioglu E, Oflaz H, Arslan A, Topcu B, Kasikcioglu HA, Umman B, Bugra Z, Kayserilioglu A. Aortic elastic properties in athletes using anabolic–androgenic steroids *Int J Cardiol* 2007; 114: 132-4.
- [19] Bosland MC. Chemical and hormonal induction of prostate cancer in animal models. *Ural Oncol* 1996; 2: 103-10.
- [20] Pylkkänen L, Jahnukainen K, Parvinen M, Santti R. Testicular toxicity and mutagenicity of steroidal and non-steroidal estrogens in the male mouse. *Mutat Res* 1991; 261: 181-91.
- [21] Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8: 235-43.
- [22] Lima AP, Cardoso FB. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. *RBCS* 2011; 9: 39-46
- [23] Durateston<sup>®</sup>: solution for intramuscular injection. Technical manager: Remaldo Sinnemann. São Paulo: Organon do Brasil Indústria e Comércio Ltda. Drug labeling.
- [24] Rangel AA, Mendes RP, Clapauch R, Barros JC, Lordello S. Síndrome de Klinefelter associada a lúpus eritematoso sistêmico. Interferência dos esteroides sexuais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46: 299-305.
- [25] Sakurai I, Kouda T, Fukumoto T, Hatamura I, Hirao Y. Cytological changes of ovarian oocytes in the polycystic ovary induced by injection of testosterone propionate in mice. *J Mamm Ova Res* 2010; 27: 220-4.
- [26] Rasul KH, Aziz FM. The effect of sustanon (testosterone derivatives) taken by athletes on the testis of rat. *JJBS* 2012; 5: 113-9

- [27] Gollapudi BB, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the boné marrow micronucleus test. *Mutat Res* 1995; 347: 97-9.
- [28] Bragança-Pereira CA. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Maonteleso Neto R editors. *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação*, São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 1991, p. 113-21.
- [29] Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Bulário eletrônico*. Available at <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B25634-1-0%5D.PDF>. Access 28 June 2012.
- [30] Torres-Bugarín O, Covarrubias-Bugarín R, Zamora-Perez AL, Torres-Mendoza BMG, García-Ulloa M, Martínez-Sandoval FG. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *Brit J Sport Med* 2007; 41: 592-6.
- [31] Choy WN. Regulatory Genetic Toxicology tests. In Choy WN editors. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, New York: Marcel Dekker Inc. 2001, p. 93-114.
- [32] Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
- [33] Lise MLZ, Silva TSG, Ferigolo M, Barros HMT. O abuso de esteroides anabólico-androgênicos em atletismo. *Rev Ass Med Brasil* 1999; 45: 364- 370.
- [34] Denham BE. When science, politics, and policy collide: on the regulation of anabolic-androgenic steroids, steroid precursors, and “dietary supplements” in the United States. *J Sport Soc Issues* 2011; 35: 3-21.
- [35] Guerra TMM, Bion FM, Almeida MG. Avaliação de espermograma e PSA em praticantes de musculação atlética (fisiculturistas). *Fit Perf J* 2005; 4: 220-6
- [36] Oliveira DG. Efeito clastogênico do Deca-Durabolin em ratos, mediante a análise do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. *Plural* 2000; 1; 91-100.
- [37] Carmo CA, Gonçalves ÁLM, Salvadori DMF, Maistro EL. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J Appl Toxicol* 2011. doi: 10.1002/jat.1701. Access 30 June 2012.
- [38] Boff SR. Efeitos colaterais dos esteróides anabolizantes sintéticos. *R Bras Ci e Mov* 2008; 16: 123-7.
- [39] Fischer WH, Keiwan A, Schmitt E, Stopper H. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis* 2001; 16: 209-12.

- [40] Stopper H, Schmitt E, Gregor C, Mueller SO, Fischer WH. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis* 2003; 18: 243-7.
- [41] Kayani MA, Parry JM. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutat Res* 2008; 651: 40-5.
- [42] Joachim GL. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000; 21: 40-54.
- [43] Hurh YJ, Chen ZH, Na HK, Han SY, Surh YJ. 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2004; 67:1939-53.
- [44] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1102-15.
- [45] Seraj MJ, Umemoto A, Tanaka M, Kajikawa A, Hamada K, Monden Y. DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. *Mutat Res* 1996; 370: 49-59.
- [46] Clark AS, Mitre MC, Brinck-Johnsen T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res* 1995; 679: 64-71.
- [47] Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, Siddiqui MA. Anabolic androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol* 2001; 187: 90-5.
- [48] Swenberg JA. Cell proliferation and chemical carcinogenesis: conferencessummary and future directions. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 153-8.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos pode-se concluir que, em camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss, deca-durabolin<sup>®</sup>, deposteron<sup>®</sup> e durateston<sup>®</sup> induzem danos cromossômico e tem efeito citotóxico quando administrados em doses únicas de soluções dez vezes mais concentradas do que aquelas indicadas pelos respectivos fabricantes.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO H.R., ROJAS M.D., ARCEO S.D.B., *et al.* Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutat. Res.**, **609**: 43-46, 2006.
- BUTRYEE C., KUPRADINUN P. Antioxidant capacity of *Citrus hystrix* leaf using *in vitro* methods and their anticlastogenic potential using the erythrocyte micronucleus assay in the mouse. **Toxicology Letters**, **180**: S79, 2008.
- CATLIN D.H., MURRAY T.H. Performance-enhancing drugs, fair competition and Olympic sport. **JAMA**, **276**: 231-7, 1996.
- CÉLÉRIER E., AHDEPIL T., WIKANDER H., *et al.* Influence of the anabolic-androgenic steroid nandrolone on cannabinoid dependence. **Neuropharmacology**, **50**: 788-806, 2006.
- CORRIGAN B. Anabolic steroids and the mind. **Med. J. Aust.**, **165**: 222–226, 1996.
- DHILLON V.S., SINGH H., KLER R. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of hormonal drugs VI. Fluoxymesterone. **Mutat. Res.**, **342**: 103-111, 1995.
- DHILLON V.S., SINGH J.R., SINGH H., *et al.* *In vitro* and *in vivo* genotoxicity evaluation of hormonal drugs. **Mutat. Res.**, **322**: 173-183, 1994.
- DORNAS W.C., OLIVEIRA T.T. E NAGEM T.J. Efeitos adversos do abuso de esteróides anabólicos sobre o sistema cardiovascular. **Rev. Bras. Farm.**, **33**: 17-25, 2008.
- ERIKSSON A., KADI F., MALM C., *et al.* Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. **Histochem Cell. Biol.**, **124**: 167-75, 2005.
- FERRINDEZ M.D., FUENTE M., FERNFINDEZ E., *et al.* Anabolic Steroids and Lymphocyte Function in Sedentary and Exercise-trained Rats. **Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **59**: 225-232, 1996.
- FRIEDL, K.E., 2000. Effect of anabolic steroids on physical health. In: Yesalis, C.E. (Ed.), *Anabolic Steroids in Sport and Exercise*, second. Human Kinetics, Champaign, pp. 175–225.
- GOLDBERG L., MACKINNON D.P., ELLIOT D.L., *et al.* The adolescents training and learning to avoid steroids program: preventing drug use and promoting health behaviors. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, **154**: 332-8, 2000.
- HAUPT H.A., ROVERE G.D. Anabolic steroids: a review of the literature. **Am. Ft. Sports Med.**, **12**: 469-483, 1984.
- HEDDLE J.A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, **18**: 187-190, 1973.

- HICKSON R.C., BALL K.L., FALDUTO M.T. Adverse effects of anabolic steroids. **Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.**, **4**: 254-271, 1989.
- HOLDEN H.E., STUDWELL D., MAJESKA J.B. Oxymetholone: I. Evaluation in a comprehensive battery of genetic toxicology and in vitro transformation assays. **Toxicol. Pathol.**, **27**: 501-506, 1999.
- HOLLAND N., BOLOGNESI C., KIRSCH-VOLDERS M., *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat. Res.**, **659**: 93-108, 2008.
- IARMARCOVAI G., CEPPI M., BOTTA A., *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. **Mutat. Res.**, **659**: 274-283, 2008.
- 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**, **18**: 1379-1387, 2002.
- IRVING L., WALL M., NEUMARK-SZTAINER D. Story, M. Steroid use among adolescents: finding from project EAT. **J. Adolesc. Health**, **30**: 243-252, 2002.
- JOOSTEN H.F.P., ACKER F.A.A., Dobbelsteen D.J., Horbach G.J.M.J., Krajnc E.I. Genotoxicity of hormonal steroids. **Toxicology Letters**, **151**: 113-134, 2004.
- KARBALAY-DOUST S., NOORAFSHAN A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the mouse liver. **Micron.**, **40**: 471-475, 2009.
- KLÖTZ F., PETERSSON A., ISACSON D., *et al.* Violent crime and substance abuse: A medico legal comparison between deceased users of anabolic androgenic steroids and abusers of illicit drugs. **Forensic Science International**, **173**: 57-63, 2007.
- LAMB D.R. Anabolic steroids and athletic performance. In *Hormones and Sport*, Vol. 55. Serono Symposia, Raven Press, New York, U.S.A., 1989, pp. 257-273.
- LESHNER, A.I. Anabolic steroid abuse. **National Institute on Drug Abuse (NIDA) Research Report Series**, NIH Publication 00-3721, 2000.
- LI N., SONG Y., ZHANG W., WANG W., *et al.* Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of magnolia bark extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **49**: 154-159, 2007.
- LILJEQVIST S., HELLDÉN A., BERGMAN U., *et al.* Pulmonary embolism associated with the use of anabolic steroids. **European Journal of Internal Medicine**, **19**: 214-215, 2008.
- MARAVELIAS C., DONA A., STEFANIDOU M., *et al.* Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. **Toxicology Letters**, **158**: 167-175. 2005.

- MARTELLI A., MATTIOLI F., ANGIOLA M., *et al.* Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. **Mutat. Res.** **536**: 69-78, 2003.
- MATTIOLI F., GARBERO C., GOSMAR M., *et al.* DNA fragmentation, DNA repair and apoptosis induced in primary rat hepatocytes by dienogest, dydrogesterone and 1,4,6-androstatriene-17 $\beta$ -ol-3-one acetate. **Mutat. Res.**, **564**: 21–29, 2004.
- MOTTRAM D. R. E GEORGE A. J. Anabolic steroids. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, **14**: 55-69, 2000.
- NANTERMET P.V., XU J., YU Y., *et al.* Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. **J. Biol. Chem.**, **279**: 1310-22, 2004.
- NIDA - National Institute on Drug Abuse. Disponível em <<http://www.nida.nih.gov/>>. Acesso em 06/11/2008.
- PAVÃO P.R.G.; GONTIJO A.M.M.C., RIBEIRO D.A. e SALVADORI D.M.F. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.**, **21**: 5-10, 2007.
- PEREIRA A.D., ANDRADE S.F., SWERTS M.S.O., *et al.* First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, **46**: 2580-2584, 2008.
- PETERSSON A., GARLE M., GRANATH F., *et al.* Morbidity and mortality in patients testing positively for the presence of anabolic androgenic steroids in connection with receiving medical care: A controlled retrospective cohort study. **Drug and Alcohol Dependence**, **81**: 215-220, 2006.
- RABELLO-GAY, M.N. RODRIGUES, M.A. LA. R., MAONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.
- REIMANN R., KALWEIT S., LANG R., Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes *in vitro* and the mouse bone marrow micronucleus test *in vivo*. **Environ. Mol. Mutagen.**, **28**: 133-144, 1996.
- SARTO F., FINNOTO S., GIACOMELLI L., *et al.* The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, **2**: 11-17, 1987.

- SERAJ M.J., UMEMOTO A., TANAKA M., *et al.* DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. **Mutat. Res.**, **370**: 49-59, 1996.
- SILVA B.B., GEBRIM L.H., SIMÕES M.J., BARACAT E.C. E LIMA G.R. Efeitos do tamoxifeno e dos estrogênios conjugados no epitélio mamário de ratas em estro permanente. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, **22**: 2-7, 2000
- SJÖQVIST F., GARLE M., RANE A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **Lancet**, **371**: 1872–82, 2008.
- SMURAWA T.M., CONGENI J.A. Testosterone Precursors: Use and Abuse in Pediatric Athletes. **Pediatr. Clin. N. Am.**, **54**: 787-796, 2007.
- SNYDER, P.J., 2001. Androgens. In: HARDMAN Limbird, J.G.L.E., GOODMAN Gilman, A. (Eds.), *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 3<sup>ed</sup>. McGraw Hill, New York, pp. 1635– 1648.
- STEENSLAND P., HALLBERG M., KINDLUNDH A., *et al.* Amphetamine-induced aggression is enhanced in rats pre-treated with the anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate. **Steroids**, **70**: 199-204, 2005.
- STURMI J.E., DIORIO D.J. Anabolic agents. **Clinics in Sports Medicine**, **17**: 261-282, 1998
- SU T., PAGLIARO M., SCHMIDT P.J., *et al.* Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. **JAMA**, **269**: 2760-4,1993.
- TENTORI; GRAZIANI G. Doping with growth hormone/IGF-1, anabolic steroids or erythropoietin: is there a cancer risk? **Pharmacological Research**, **55**: 359-369, 2007.
- THEVIS M., KOHLER M., SCHÄNZER W. New drugs and methods of doping and manipulation. **Drug Discovery Today**, **13**: 59-66, 2008
- WEINBERG, R.A. *Uma Célula Renegada - Como o Câncer Começa*. São Paulo: Rocco, 2000
- WOOD R. Anabolic–androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans **Frontiers in Neuroendocrinology**, **29**:490-506, 2008.
- WOOD R.I. Reinforcing aspects of androgens. **Physiology & Behavior**, **83**: 279-289, 2004.

## ANEXO I

OXFORD JOURNALS      CONTACT US    MY BASKET    MY ACCOUNT

# mutagenesis

ABOUT THIS JOURNAL    CONTACT THIS JOURNAL    SUBSCRIPTIONS    CURRENT ISSUE    ARCHIVE    SEARCH

[Oxford Journals](#) > [Life Sciences & Medicine](#) > [Mutagenesis](#) > [For Authors](#) > Instructions To Authors

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

**New for 2010 – Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright licence to publish form online**

**Manuscripts must be submitted online. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below please visit the [online submission website](#). Instructions on submitting your manuscript online can be [viewed here](#).**

### SCOPE AND POLICY OF MUTAGENESIS

Mutagenesis is an international multi-disciplinary journal designed to bring together research aimed at the identification, characterization and elucidation of the mechanisms of action of physical, chemical and biological agents capable of producing genetic change in living organisms and the study of the consequences of such changes.

A variety of different types of manuscripts are published in *Mutagenesis*:

**Original articles**, reporting the results of fundamental and molecular studies upon the mechanisms of induction of point, chromosomal and genomic mutations and their roles in inherited and somatic disorders.

**Papers on guidelines for mutagenicity testing of environmental agents**, which describe and discuss the techniques and quality control standards necessary for adequate testing of environmental agents.

**Cell lines, strains, DNA probes etc.** The submission to and acceptance of a manuscript for publication in *Mutagenesis* implies that the authors will provide samples of such materials as cell lines, strains, mutants and DNA probes described in their publication to other investigators for research purposes.

**Animal husbandry.** Papers that report experiments involving live animals must include a statement that the animals were treated and housed in accordance with approved guidelines (giving the source) or supervised by an animal care committee (giving the name) or both.

**Letters to the Editors** may be submitted on current topics. Such letters may cover theoretical, social and practical aspects of mutational change, but should aim for a concise presentation.

**Reviews** The Editors welcome the submission of reviews of topics covering all aspects of mutagenic change.

**Meta-analyses** *Mutagenesis* publishes well-written systematic reviews on gene variants that conform to standards such as the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology standards (Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting: Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA*. 2000;283(15):2008-2012).

However, due to a change in policy, single gene SNP or single disease systematic reviews or meta-analyses will no longer be published, except in exceptional circumstances. The Editorial Board selects reviews of exceptional quality on very relevant topics only. For all others, we suggest consulting the HuGENet website <http://www.cdc.gov/genomics/huGENet/reviews/index.htm> in order to submit the meta-analyses elsewhere.

All manuscripts submitted to *Mutagenesis* are refereed for their pertinence, content and relevance to the scope of the journal.

### SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

*Mutagenesis* accepts submissions online at <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage>

Author Self-Archiving/Public Access policy from May 2005

For information about this journal's policy, please visit our Author Self-Archiving policy page [http://www.oxfordjournals.org/access\\_purchase/self-archiving\\_policya.html](http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/self-archiving_policya.html).

For instructions on how to submit your manuscript online please [click here](#).

For any queries please contact the editorial office:  
Prof. D H Phillips, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK.  
[Click here](#) to email the Editorial Office.

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be enclosed with the paper.

### OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

*Mutagenesis* authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open initiative](#); whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

### THE JOURNAL

- > [About this journal](#)
- > [Publishers' Books for Review](#)
- > [Rights & Permissions](#)
- > [Dispatch date of the next issue](#)
- > [This journal is a member of the Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#)
- > [We are mobile – find out more](#)

### Published on behalf of

- > [The UK Environmental Mutagen Society](#)

### Impact factor: 3.183

Editor-in-Chief  
Professor David Phillips  
> [View full editorial board](#)

### FOR AUTHORS

- > [Instructions to authors](#)
- > [Online submission](#)
- > [Submit Now!](#)



Open access options for authors - visit [Oxford Open](#)

- > [Self-archiving policy](#)



- > [This journal enables compliance with the NIH Public Access Policy](#)

### ALERTING SERVICES

- > [Email table of contents](#)
- > [Email Advance Access](#)
- > [CiteTrack](#)
- > [XML RSS feed](#)

### CORPORATE SERVICES

- > [Advertising sales](#)
- > [Reprints](#)
- > [Supplements](#)

If you choose the Open Access option you can pay the charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. Open access charges can be viewed [here](#) in detail; discounted rates are available for authors based in some developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries). Please note that these charges are in addition to any colour charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

#### CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

At the point of submission, Mutagenesis policy requires that each author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated - including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. When considering whether you should declare a conflicting interest or connection please consider the conflict of interest test: Is there any arrangement that would embarrass you or any of your co-authors if it was to emerge after publication and you had not declared it?

As an integral part of the online submission process, Corresponding authors are required to confirm whether they or their co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will then be required to submit a completed [Conflict of Interest form](#) to the Production Office. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy.

If the manuscript is published, Conflict of Interest information will be communicated in a statement in the published paper.

#### PROOFS

Authors are sent page proofs electronically as a PDF file, or by post if required. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors and returned to the publishers by express (special delivery) post. Alternatively, to save time, corrections may be given to Oxford University Press by fax: +44 (0)1865 353773. Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a Note added in proof. A charge is made to authors who insist on amendment within the text at the page-proof stage.

#### LICENCE TO PUBLISH

It is a condition of publication in the Journal that authors grant an exclusive licence to UK Environmental Mutagen Society. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be as widely disseminated as possible. Authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, and Oxford University Press is notified in writing and in advance.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

#### PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs require only correction of typographical errors.

##### Sections of the manuscript

Regular full-length papers should be subdivided into the following sequence of sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to figures, Tables. The Title page must include the telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. In the Journal, the Materials and methods, Acknowledgements and References sections are printed in smaller type to accommodate more text. The Materials and methods section must give precise details of strains, concentrations and solvents. Where an activation system has been included it is necessary to know (i) the source, (ii) the inducer and (iii) the concentration treatment time, and incubation time with conditions should be given. Positive and negative controls together with their concentrations must be included. The number of replicates and the number of repeat experiments should be stated. Additional factors for *in vivo* tests should include age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. A detailed dose regime is required. Papers for the Mutagenicity testing section should conform to the above requirements. In addition, results should be presented in tabular form.

##### General format

Prepare your manuscript text using a Word processing package (save in .doc or .rtf format). Use double spacing (space between lines of type not less than 6 mm) throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Number each page. Please avoid footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Enter text in the style and order of the journal. Type references in the correct order and style of the journal. Type unjustified, without hyphenation, except for compound words. Type headings in the style of the journal. Use the TAB key once for paragraph indents. Where possible use Times for the text font and Symbol for the Greek and special characters. Use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Maths, <sup>Superscript</sup> and <sub>Subscript</sub> characters. Clearly identify unusual symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1. Mark the approximate position of each figure and table.

Check the final copy of your paper carefully, as any spelling mistakes and errors may be translated into the typeset version.

##### Abstract

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should be a single paragraph not exceeding 300 words. Please abide strictly by this limitation of length. Published papers will only have the first 300 words of their abstracts incorporated into Medline, text in excess of this limit will be lost. The Abstract should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided.

##### Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'

- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' ([Full NIH-approved list of UK funding agencies](#)). Grant numbers should be given in brackets as follows: '[grant number xxxx]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers xxxx, yyyy]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]':

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789].'

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See [Depositing articles in repositories – information for authors](#) for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

#### Acknowledgements

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

#### References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them) may be included. In the text, references should be cited, in order of appearance, as a number in brackets, e.g. (1). These should be on the line, do not use superscript. At the end of the manuscript the citations should be listed numerically. References should include, in the following order: all authors' names (with surnames and initials inverted), year, paper title in full, journal title, volume number and inclusive page numbers. If a book, the name and address of the publisher should be given. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and underlined to indicate italics.

References should therefore be listed as follows:

1. Hartley-Asp, B. and Hyldig-Nielsen, F. (1984) Comparative genotoxicity of nitrogen mustard and nor-nitrogen mustard. *Carcinogenesis*, **5**, 1637-1640.
2. Kirk, J.T.O. and Tilney-Bassett, R.A.E. (1978) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd revised edn. Elsevier/North Holland, New York.
3. Warren, W. (1984) The analysis of alkylated DNA by high pressure liquid chromatography. In Venitt, S. and Parry, J.M. (eds), *Mutagenicity Testing - a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 25-44.

Personal communication (J.Smith, personal communication) should be authorized by those involved, in writing, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (B.Smith and N.Jones, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

#### Tables

Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title.

Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail. An arrow in the text margin should be used to indicate where a table should be inserted in the text.

#### Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred to in the text as Figure 1 etc., which should be abbreviated to 'Fig. 1.' only in the figure legend. Figures must be prepared at publication quality resolution, using applications capable of generating high-resolution TIFF files of at least 300 pixels per inch at the final printed size for colour figures and photographs, and 1200 pixels per inch for black and white line drawings. Although some other formats can be translated into TIFF format by the publisher, the conversion may alter the tones, resolution and contrast of the image. Digital colour art should be submitted in CMYK rather than RGB format, as the printing process requires colours to be separated into CMYK and this conversion can alter the intensity and brightness of colours. Therefore authors should be satisfied with the colours in CMYK (both on screen and when printed) before submission. Please also keep in mind that colours can appear differently on different screens and printers. Failure to follow these guides could result in complications and delays.

**Photographs.** These must be submitted in the desired final size so that reduction can be avoided. The type area of a page is 248 x 185 mm (width) and photographs, including their legends, must not exceed this area. A single column is 88 mm wide. A double column is 185 mm wide. Ideally, photographs should fit either a single column or a double column. Photographs should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a rule on the photographs.

**Colour figures.** There is a special charge for the inclusion of colour figures. The cost is £350 per figure. Orders from UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the EU, we will assume that the service is provided for business purposes, please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

**Line drawings.** Please provide these as clear, sharp prints, suitable for reproduction as submitted. No additional artwork, redrawing or typesetting is done. Therefore, all labelling should be on the original drawing. Ensure that the size of lettering is in proportion with the overall dimensions of the drawing. Ideally, line drawings should be submitted in the desired final size to avoid reduction (maximum dimensions 248 x 185 mm including legends) and should fit either a single (88 mm) or a double column width (185 mm). If submitting line drawings which require reduction, please check that the lettering will be clearly legible after the drawing has been reduced to the size at which it will be printed. After reduction, letters should not be smaller than 1.5 mm in height.

**Figure legends.** These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text should not be redefined in the legend.

#### Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn).

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

#### Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

#### LANGUAGE EDITING

Particularly if English is not your first language, before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. If you would like information about one such service please click [here](#). There are other specialist language editing companies that offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

#### OFFPRINTS

The publishers supply the URL upon electronic publication. Offprints can be purchased using the Oxford Journals Author Services site.

#### AUTHOR SELF-ARCHIVING/PUBLIC ACCESS POLICY

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#).

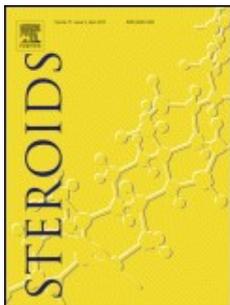
Online ISSN 1464-3804 - Print ISSN 0267-8357

Copyright © 2012 United Kingdom Environmental Mutagen Society

**OXFORD**  
UNIVERSITY PRESS

[Site Map](#) [Privacy Policy](#) [Frequently Asked Questions](#)

## ANEXO II



**ISSN:** 0039-128X

### DESCRIPTION

*Steroids* is an international journal devoted to original research on all aspects of steroids. Its focus is on both experimental and theoretical studies in chemistry and physiochemistry, biosynthesis, metabolism, molecular biology, physiology, pharmacology, analytical techniques, comparative endocrinology, clinical research, mode of action (including that of related peptides), and the role of steroids on growth and differentiation.

### GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

##### *Types of paper*

Significant original research papers and pertinent reviews on all aspects of steroids will be considered for publication. Specifically, both experimental and theoretical studies dealing with the following areas of investigation are welcome: chemistry and physiochemistry; biosynthesis; metabolism; molecular biology; physiology; pharmacology; analytical techniques; comparative endocrinology; clinical research; mode of action (including that of related peptides); and the role of steroids on growth and differentiation. Relevant compounds also include non-steroidal analogs that are inhibitors or activators of steroid biosynthetic enzymes or ligands for steroid hormone receptors

Letters to the editor are welcome, for editing and publication at the discretion of the editor. Rapid Communications will be considered if material is of unusual interest and particularly timely.

#### BEFORE YOU BEGIN

##### *Ethics in Publishing*

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>. When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) [http://europa.eu.int/comm/food/fs/aw/aw\\_legislation/scientific/86-609-eec\\_en.PDF](http://europa.eu.int/comm/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_en.PDF) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/> Full details of any anesthetic or analgesic dose and treatment must be given.

##### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you

are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.**

As a service to our authors, Elsevier will deposit to PubMed Central (PMC) author manuscripts on behalf of Elsevier authors reporting NIH funded research. This service is a continuation of Elsevier's 2005 agreement with the NIH when the NIH introduced their voluntary 'Public Access Policy.'

The service will help authors comply with the National Institutes of Health (NIH) revised "Public Access Policy," effective April 7, 2008. The NIH's revised policy requires that NIH-funded authors submit to PubMed Central (PMC), or have submitted on their behalf, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Elsevier will send to PMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and sent to Elsevier's production department, and that reflects any author-agreed changes made in response to peer-review comments. Elsevier will authorize the author manuscript's public access posting 12 months after final publication. Following the deposit by Elsevier, authors will receive further communications from Elsevier and NIH with respect to the submission.

Authors are also welcome to post their accepted author manuscript on their personal or institutional web site. Please note that consistent with Elsevier's author agreement, authors should not post manuscripts directly to PMC or other third party sites. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and society publishing partners.

As a leading publisher of scientific, technical and medical (STM) journals, Elsevier has led the industry in developing tools, programs and partnerships that provide greater access to, and understanding of, the vast global body of STM information. This service is an example of Elsevier willingness to work cooperatively to meet the needs of all participants in the STM publishing community.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some

cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights> .

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online. Visit the submission site of the journal at <http://ees.elsevier.com/steroids> You will be guided through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail.

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### **Article structure**

Manuscripts Arrange the manuscript in the following order: title page, abstract, keywords, text, acknowledgments, references, footnotes, tables, figure legends, and figures. Number the pages in sequence, with the title page as page 1, the abstract as page 2, etc. Text: Arrange the body of the manuscript in the following order: Introduction, Experimental, Results, Discussion. Title page

Give the full title of paper. Do not use asterisks or other extraneous symbols in the title. Give the first name, middle initial, and last name of all authors. List each author's institutional affiliation(s). Show the address of each author at the time of the study as

well as the present address if it differs.

Provide the name and address of the corresponding author to whom questions and reprint requests should be sent. Give the name and address of the institution from which the work originated.

#### Text

Arrange the text in the following order:

**Introduction:** The rationale for the study. Provide a brief account of the nature, approach and importance of the study to be presented. **Experimental:** A clear and precise description of the experimental procedures. Identify all drugs and chemicals used, dosages, and routes of administration. All methods must be referenced and/or described in sufficient detail to enable a reader to repeat the experiment. For animal and human studies, the experimental protocol must be humane and ethical. In all manuscripts reporting the results of human studies, a statement must appear in the Experimental section indicating that approval was obtained from the institutional review board and that all human subjects signed written informed consent. **Results:** A factual account of the study's findings. Present these as logically appropriate in text, tables, or figures; do not repeat in the text what is demonstrated in a table or figure. **Discussion:** Place the results of the study in present and historical context and denote its importance to the field. Ensure that all conclusions are justified by the results of the study.

#### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### Abstract

A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results, and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. References should be avoided but, if essential, they must be cited in full. Avoid non-standard or uncommon abbreviations; if they must be used, define them at their first mention in the abstract itself.

#### Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of six keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations; only firmly established ones should be used.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Acknowledge grants, sponsors, funding sources, and individuals who provided significant assistance. Include the affiliations of individuals being thanked. It is the author's responsibility to obtain permission from all those mentioned by name, because readers may infer their endorsement.

### **Units of measure**

Standard metric units are preferred. SI units are optional, except that the use of Bq (becquerel) is not acceptable; use Ci (curie) or dpm (disintegrations per minute). Centrifugation should be described in terms of force ( $\_g$ ), not as rpm.

### **Nomenclature and units**

Refer to drugs by their approved generic names. If trade names are used, the generic equivalent should be given parenthetically at the first use. Identify compounds by their formal chemical name at first use; thereafter the trivial name may be used. All names should be in accordance with the most recent IUPAC-IUB rules on the nomenclature of steroids published in *Pure and Applied Chemistry* 61, 1783-1822, 1989. Substituted steroids should be named so that only one functional group is designated as a suffix and all other substituents are listed as X steroids 71 (2006) IX-XI prefixes. If the first letter of the suffix is a vowel, the terminal 'e' of the name of the hydrocarbon should be dropped (e.g., etiocholan-17-one). Unsaturation should be indicated by writing the locant number for the double bond(s) before the suffix (e.g., 3-hydroxyandrost-5-en-17-one). Trivial names may be modified by prefixes indicating substituents (e.g., 17-hydroxyprogesterone) but must not be more cumbersome than the systematic names they replace. Chemically impossible trivial names (e.g., 20-hydroxyprogesterone) are not acceptable. Alcohols are named as ols or hydroxy derivatives, not as dihydroketones. Isotope location should be designated by a prefix

bracket placed directly before the part of the name to which it applies (i.e., without a space or hyphen): e.g., 3,20-dihydroxy-[4-<sup>14</sup>C]pregnan-7-one; [3-<sup>3</sup>H]methoxyandrostan-17-one, 11<sup>?</sup>,21-dihydroxy-[1,2-<sup>3</sup>H; 4-<sup>14</sup>C]pregnane-3,20-dione. Iodinated compounds, in which iodine is part of the structure, are to be labeled in the same manner; e.g., [16<sup>?</sup>-<sup>125</sup>I]iodoestradiol; 3-hydroxy- [21-<sup>125</sup>I]iodopregn-5-en-20-one.

#### *Compound identity and purity*

##### **Naturally occurring compounds**

Authors must include copies of key spectra for the characterization of new compounds. This material should be submitted separately as "Supporting Information" which will not appear in the journal, but will be used by reviewers and be available on the web (see below).

##### **Synthetic compounds**

**Identification of structure:** Sufficient spectroscopic information must be presented to establish the structural identity of all new compounds. These data should appear in the Experimental Section and be adequate for unambiguous comparisons to be made between the reported compound and the same compound prepared independently. A list of proton or carbon-13 NMR peaks is generally sufficient, but if structural identification was based on NMR data, peak assignments should also be given. Chemical shift data should be given only to two decimal places. Infrared absorptions diagnostic for key functional groups are also helpful, and high resolution mass spectroscopic data can provide an additional criterion of compound identity. When a series of closely related compounds is reported, spectroscopic data can be presented in a table, or full spectroscopic data for a representative member can be presented, with comments made on the spectral features unique to other members of the series. For known compounds, the source or literature reference to the method of preparation and characterization must be provided. Graphic images of spectra and additional information related to structure identification may be presented as Supporting Information, which will not appear in the journal but will be available on the web.

##### **Criteria for the purity of all compounds and of compounds with biological data:**

All new compounds reported need to be pure. Evidence of high purity is essential where biochemical or biological assay data are presented and related to compound structures; these compounds are termed "SAR compounds". The purity of SAR compounds should be more than 98 percent; the purity of other compounds should be more than 95 percent. Any questions related to the purity of SAR compounds should be presented in the Results section of the manuscript.

Evidence for purity can take many forms: Combustion analyses for carbon, hydrogen and nitrogen is adequate. These data should appear in the Experimental Section and should agree with the calculated data within 0.4 percent, a recommended form for presentation is: C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: calcd. C, 68.12; H, 7.30; N, 4.41. Found. C, 68.50; H, 7.18; N, 4.26.

When satisfactory combustion analyses are not available, evidence of purity should be provided by HPLC chromatograms run in two divergent solvent systems (typically normal and reversed phase solvent systems) or by high quality proton NMR spectra obtained at high signal-to-noise. These chromatograms or spectra should be included as supplementary data.

##### **Database linking and Accession numbers**

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or

number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INteractions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)
- **ASTM**: ASTM Standards Database (ASTM ID: G63)

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### Color artwork

Figures

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS, or MS Office files) and with good resolution, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Colour figures

If together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications that can arise in converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the colour illustrations].

#### **Figure captions**

##### Figure legends

Provide a concise legend for each figure that is sufficiently clear so that the figure can be understood without reference to the text. Legends to figures should be presented on a separate page. Identify and explain all abbreviations, symbols, and figure parts. The use of symbols in legends is restricted to standard ones that can be typeset; it is usually preferable to place the key symbols directly on the art.

##### *Tables*

Provide a title for each table. If a table must be continued to a second page, repeat all headings.

#### **References**

##### **Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full in the abstract itself. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

##### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*

2010;163:51–9. Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith

RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first

6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### *Video data*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. To ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### *Supplementary data*

Preparation of supplementary data

Elsevier accepts supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats: TIFF, EPS or PDF. MS Office files (Word, Powerpoint, Excel). Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>."

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any

item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

**DNA sequences and GenBank Accession numbers**

Many journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "(GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)". Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "(GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)". In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "(GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

**Style**

Note that Steroids uses the serial comma, e.g., Jones, Smith, and Brown (comma before

'and' in a series of three or more items). American-style spelling is required. For example: color, not colour; hydrolyze, not hydrolyse; estrogen, not oestrogen; labeled, not labelled. End-of-line hyphenation should be according to American-style word division (based on pronunciation, not word derivation). Leave a space between number and unit (50 mg, 3.5 M). For solvent proportions use the following style: ethanol/methanol (70:30 v/v) or ethyl acetate/isooctane (1:1).

### **Letters to the Editor**

There is no specific format but there should be a short abstract of no more than 2 sentences; and no more than 5 references. There is word limit of 2, 500 words, not to exceed 2 -3 published pages including figures , tables, abstract and references. A maximum of any combination of 2 tables or figures is allowed.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>