

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

WAGNER CORSINI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DEGENERAÇÃO NEURONAL E DOSES
SUPRAFISIOLÓGICAS DE DOIS TIPOS DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES EM
ENCÉFALOS DE RATOS**

ALFENAS/MG

2022

WAGNER CORSINI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DEGENERAÇÃO NEURONAL E DOSES
SUPRAFISIOLÓGICAS DE DOIS TIPOS DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES EM
ENCÉFALOS DE RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues

Coorientador (a): Profa. Dra. Alessandra Esteves

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Corsini, Wagner.

Associação entre degeneração neuronal e doses supra-fisiológicas de dois tipos de esteroides anabolizantes em encéfalos de ratos / Wagner Corsini. - Alfenas, MG, 2022.

107 f. : il. -

Orientador(a): Maria Rita Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Esteroides Anabolizantes. 2. Densidade neuronal. 3. Locus ceruleus. 4. Hipotálamo. I. Rodrigues, Maria Rita, orient. II. Título.

WAGNER CORSINI

ASSOCIAÇÃO ENTRE DEGENERAÇÃO NEURONAL E DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE DOIS TIPOS DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES EM ENCÉFALOS DE RATOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 15 de julho de 2022.

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Sônia Aparecida Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Sônia Aparecida Figueiredo, Professor(a) Visitante**, em 28/07/2022, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Borges de Araújo Paula, Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0778932** e o código CRC **E6956CF8**.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a minha esposa, a minha mãe e aos meus irmãos, que são a base e razão da minha existência. Dedico a minha orientadora e coorientadora, que diretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas das vezes, as palavras não conseguem expressar o quanto somos gratos por tudo que temos e conquistamos, mas podem ficar gravadas por toda vida, demonstrando a satisfação e a felicidade de poder contar com pessoas tão importantes que fazem parte do nosso destino.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela dádiva da vida, pela fé que nunca me faltou, por sempre me amparar e acolher nos momentos mais difíceis da vida, por toda inspiração, força e coragem para sempre seguir em frente.

Agradeço a minha mãe Edna, que sempre me guiou para os melhores caminhos, que se comprometeu a me educar e me tornar um bom ser humano, com muito respeito e amor. Aos meus irmãos Maurício e Wanderson, que foram essenciais no meu desenvolvimento como ser humano, sempre sendo meus exemplos de dedicação, esforço e caráter.

Agradeço a minha esposa Andréia, por todo carinho e amor, por sempre estar ao meu lado apoiando e me tornando mais forte e completo, sou grato pela sua generosidade, atenção, compreensão e por acreditar em mim, por fazer tudo ficar mais simples e belo, por cuidar de mim e fazer parte da minha vida.

À minha orientadora, Maria Rita, por confiar em mim desde o início, por compartilhar sua sabedoria e experiência, e contribuir de forma direta nesta nova conquista, tão importante para mim.

À minha coorientadora, Alessandra Esteves, que sempre me motivou e apoiou a seguir os meus estudos, com muito empenho e entusiasmo, dedicando seu tempo e compartilhando seus conhecimentos, auxiliando desde o início da minha formação acadêmica e crescimento profissional.

Ao Departamento de Anatomia, especialmente ao Prof. Wagner Costa Rossi Junior, pelas suas orientações e incentivo, ao Prof. Túlio de Almeida Hermes, pela sua importante colaboração nos métodos para conclusão deste estudo. Agradeço também a Nicéia, por toda ajuda durante o desenvolvimento desta pesquisa, sempre mantendo a organização do laboratório.

Agradeço ao Bruno Damião, pelo apoio e contribuição direta para a elaboração e execução deste trabalho científico.

A todos aqueles que me ajudaram de forma direta ou indiretamente, para a realização e conclusão deste sonho. Muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Pelo apoio da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(CORA CORALINA, 1997)

RESUMO

O uso abusivo de esteroides anabolizantes obteve um exponencial crescente desde sua origem, tornando-se um assunto importante de ser questionado e avaliado, sendo necessário educar a população em geral, principalmente, o público do sexo masculino e de meia idade, considerado o público alvo. Os efeitos e consequências desencadeadas pelos esteroides anabolizantes no organismo acontecem de diversas maneiras, podendo afetar vários órgãos e tecidos. De acordo com a literatura científica, seus danos estão relacionados com o sistema reprodutor masculino, como: atrofia testicular e problemas hormonais. Além disso, podem causar efeitos cardiovasculares (fator potencial de morte súbita no indivíduo), hepáticos, renais, no sistema hematopoiético, no perfil lipídico sanguíneo e, principalmente, no sistema nervoso central, causando agressividade, irritabilidade, depressão, além de afetar o domínio cognitivo, como: aprendizado, memória, atenção e a capacidade de reconhecer informações. As amostras deste experimento fazem parte do acervo de amostras histológicas do Departamento de Anatomia da Unifal-MG, uma vez que, foram coletadas de um experimento de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Neste experimento, foram utilizadas 70 amostras de encéfalos de ratos machos Wistar, com idade de 60 dias. Os animais foram expostos a dois esteroides anabolizantes distintos, o Cipionato de Testosterona (DP) e o Decanoato de Nandrolona (DC), considerados os anabolizantes mais conhecidos entre os usuários e também no Brasil. Para o estudo, os animais foram divididos em dois tratamentos: DP e DC, divididos em sedentários e exercício físico, subdivididos em três outros grupos, que foram separados em doses: 5mg/kg, 10mg/kg e 15mg/kg, cada grupo constavam 5 animais, assim formando 12 grupos, além disso, foram formados dois grupos controles (5 animais cada), um para grupo sedentário (CS) e outro para o exercício físico (CE), totalizando em 14 grupos. Os encéfalos seguiram todos os procedimentos histológicos, para posterior análise. Por conseguinte, foram realizadas as estimativas de corpos de neurônios no locus ceruleus e hipotálamo, incluindo a realização das técnicas de Ensaio de Tunel e coloração de Von Kossa. Também foram realizadas as mensurações de áreas corticais: retrosplenial, motora e somatossensorial. No locus ceruleus e no hipotálamo, foi possível observar significativa redução de neurônios nos grupos sedentários e exercitados, tratados com ambos anabolizantes, também sendo possível observar esta redução quando comparados o grupo controle sedentário com os grupos exercitados e tratados com anabolizantes. As áreas corticais: motora e somatossensorial, apresentaram significativas reduções em suas mensurações, nos grupos sedentários. Portanto, os resultados obtidos apontam que ambos os esteroides anabolizantes podem causar efeitos degenerativos no

locus ceruleus e no hipotálamo. De acordo com a técnica de Von Kossa, sugere-se que a provável causa da morte neuronal é a necrose, ocasionada por desequilíbrio do cálcio intracelular, também sendo possível concluir que o uso crônico de esteroides anabolizantes, podem causar redução no córtex motor e somatossensorial em animais não exercitados.

Palavras-chave: Esteroides Anabolizantes; Densidade neuronal; Locus ceruleus; Hipotálamo.

ABSTRACT

The abusive use of anabolic steroids has been growing exponentially since its origin, becoming an important issue to be questioned and evaluated, being necessary to educate the general population, especially the middle-aged male public, considered the target audience. The effects and consequences triggered by anabolic steroids in the body happen in ways, and they may affect several organs and tissues. According to the scientific literature, their damage is related to the male reproductive system, such as: testicular atrophy and hormonal problems; in addition, they can affect the cardiovascular system, with a potential factor of causing sudden death, are also reported liver, kidney, hematopoietic system cells effects, blood lipid profile and mainly can cause effects on the central nervous system, such as: increased aggressiveness, irritability, depression, and affect the cognitive domain, such as: learning, memory, attention and the ability to recognize information. The samples of this experiment are part of the Anatomy Department histological collection at Unifal-MG, collected from a doctoral experiment from the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences. In this experimento, 70 samples of encephalo from 60-day-old male Wistar rats were used. The animals were exposed to two different anabolic steroids, Testosterone Cypionate (DP) and Nandrolone Decanoate (DC), both are among the anabolic steroids most commercialized and known in Brazil by sporting and amateur users. For the study, the animals were divided into two treatments: DP and DC, divided into sedentary and exercise, subdivided into three other groups, which were separated into doses: 5mg, 10mg and 15mg, each group consisted of 5 animals, thus forming 12 groups. Addition, two control groups (5 animals each one) were formed, one for sedentary group (CS) and another for exercise (CE), thus 14 groups. The encephalos were submitted to all histological procedures, for further analysis. Therefore were performed, estimates of neuron bodies in the locus ceruleus and hypothalamus, including the Tunnel Assay and Von Kossa staining techniques. Also were performed measurements of retrosplenial, motor and somatosensory cortical areas. In the locus coeruleus and hypothalamus, it was possible to observe a significant reduction of neurons in the sedentary and exercised groups, treated with both anabolic steroids. It was also possible to observe this reduction when comparing the sedentary control group with the exercised and anabolic steroid treated groups. The motor and somatosensory cortical areas showed significant reductions in their measurements in the sedentary groups. Therefore, the results obtained indicate that both anabolic steroids can cause degenerative effects in the locus coeruleus and hypothalamus and, according to the Von Kossa technique, it is suggested that the probable cause of neuronal death is necrosis, caused by an imbalance of intracellular calcium. It is also possible

to conclude that the chronic use of anabolic steroids can cause a reduction in the motor and somatosensory cortex in non-exercised animals.

Keywords: Anabolic Steroids; Neuronal Density; Locus coeruleus; Hypothalamus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato, identificação das áreas corticais em estudo e suas delimitações	44
FIGURA 2 –	Fotomicrografia do tronco cerebral de rato, identificação do Locus ceruleus	45
FIGURA 3 –	Fotomicrografia para identificação do Hipotálamo do cérebro de rato	46
FIGURA 4 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e análise de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona, no Locus ceruleus	55
FIGURA 5 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e análise de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Cipionato de Testosterona, no Locus ceruleus	56
FIGURA 6 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona, no Locus ceruleus	57
FIGURA 7 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona, no Locus ceruleus	58

FIGURA 8 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca ²⁺ , de grupos de animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona, no Hipotálamo	65
FIGURA 9 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca ²⁺ , de grupos de animais exercitados tratados com Cipionato de Testosterona, no Hipotálamo	66
FIGURA 10 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca ²⁺ , de grupos de animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona, no Hipotálamo	67
FIGURA 11 –	Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca ²⁺ , de grupos de animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona, no Hipotálamo	68

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – Média do número de corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Locus ceruleus, dos grupos dos animais sedentários e exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas 51
- GRÁFICO 2 – Média do número de corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Locus ceruleus, comparando o grupo dos animais exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas ao grupo CS..... 52
- GRÁFICO 3 – Média dos corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Hipotálamo, dos grupos dos animais sedentários e exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas 61
- GRÁFICO 4 – Média de células neuronais (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Hipotálamo, comparando o grupo dos animais exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses ao grupo CS 62
- GRÁFICO 5 – Média do volume do córtex cerebral retrosplenial (μm), grupos de animais sedentários e exercitados expostos a

	dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg).....	71
GRÁFICO 6 –	Média do volume do córtex cerebral motor (μm), grupos dos animais sedentários e exercitados expostos a dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg)	74
GRÁFICO 7 –	Média do volume do córtex cerebral sensitivo (μm), grupos de animais sedentários e exercitados expostos a dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg)	77
GRÁFICO 8 –	Média do volume do córtex cerebral motor (μm). Análise comparativa entre os grupos tratados com dois diferentes tipos de esteroides anabolizantes, em suas distintas doses de concentrações 5, 10 e 15mg, que praticaram exercício físico e o grupo CS	78
GRÁFICO 9 –	Média do volume da área cortical sensitiva (μm). Análise comparativa entre os grupos tratados com dois diferentes tipos de esteroides anabolizantes, em suas distintas doses de concentrações 5, 10 e 15mg, que praticaram exercício físico e o grupo CS	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Número de animais e grupos de estudos	42
TABELA 2 –	Quantificação dos corpos de neurônios no Locus ceruleus. Grupos experimentais sedentários/doses, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância	49
TABELA 3 –	Quantificação dos corpos de neurônios no Locus ceruleus. Grupos experimentais que praticaram exercício físico, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância	49
TABELA 4 –	Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA no Locus ceruleus. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor p e nível de significância	52
TABELA 5 –	Quantificação dos corpos de neurônios, grupos experimentais (sedentários/doses) no Hipotálamo. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância	59
TABELA 6 –	Quantificação de corpos de neurônio, no Hipotálamo. Grupos experimentais que praticaram exercício físico, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância	60

TABELA 7 –	Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no Hipotálamo. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância	62
TABELA 8 –	Espessuras do córtex cerebral retrosplenial (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical retrosplenial, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	69
TABELA 9 –	Espessuras do córtex cerebral retrosplenial (μm). Grupos experimentais que praticaram exercício físico. Média \pm desvio padrão da densidade cortical retrosplenial, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	70
TABELA 10 –	Espessuras do córtex cerebral motor (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	72
TABELA 11 –	Espessuras do córtex cerebral motor (μm). Grupos de animais exercitados. Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	72
TABELA 12 –	Espessuras do córtex cerebral sensitivo (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução cortical em	

	porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	75
TABELA 13 –	Espessuras do córtex cerebral sensitivo (μm). Grupos experimentais que praticaram exercício físico. Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	76
TABELA 14 –	Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no volume do córtex motor (μm). Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução neuronal em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	78
TABELA 15 –	Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no volume do córtex sensitivo (μm). Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução neuronal em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância	79

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ArcD	Núcleo Arqueado
AST	Aspartato Aminotransferase
BLA	Amígdala Basolateral
CA	Califórnia
CE	Controle Exercício
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CM-Cb	Camada Molecular do Cerebelo
CS	Controle Sedentário
DA	Doença de Alzheimer
DAC	Doença Arterial Coronariana
DC	Decanoato de Nandrolona
DCE	Decanoato de Nandrolona Exercício
DCS	Decanoato de Nandrolona Sedentário
DCV	Doenças Cardiovasculares
DFT	Demência Fronto-Temporal
DH	Doença de Huntington
DM	Núcleo Dorsomedial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Cipionato de Testosterona
DPE	Cipionato de Testosterona Exercício
DPS	Cipionato de Testosterona Sedentário
EAA	Esteroides Anabolizantes Androgênicos
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EUA	Estados Unidos América
f	Fórnix
FE	Função Executiva
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IL	Interleucina
IMR	Imagens de Ressonância Magnética
LC	Locus ceruleus

LDH	Lactato Desidrogenase
mt	Trato Mamilotalâmico
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina
NMDA	N-metil D-Aspartato
NTM	Núcleo Trigeminal do Mesencéfalo
NS	Não Significativo
ON	Óxido Nítrico
PA	Pressão Arterial
PBS	Phosphate-Buffered Saline, ou Tampão Fosfato-Salino
PCS	Pedúnculo Cerebelar Superior
PCT	Post Cycle Therapy
PM	Memória Prospectiva
QI	Quociente de Inteligência
RM	Memória Retrospectiva
rpm	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SI	Córtex Somatossensorial Primário
SII	Córtex Somatossensorial Secundário
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VM	Núcleo Ventromedial
VPN	Núcleo Ventral Posterior
3V	Terceiro Ventrículo
4V	Quarto Ventrículo

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligrama
mL	Mililitros
kg	Quilograma
cm	Centímetro
M	Molar
ph	Potencial Hidrogeniônico
C	Celsius
ng	Nanograma
dl	Decilitro
β	Beta
®	Marca Registrada
α	Alfa
%	Porcentagem
°	Grau
x	Vezes
μm	Micrograma
™	Trade Mark, ou Marca Comercial
NaCl	Cloreto de Sódio
Ca^{2+}	Cálcio
\pm	Mais ou Menos
>	Maior
<	Menor
=	Igual
δ	Delta
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)	26
2.2	USO NO ESPORTE	27
2.3	EFEITOS ADVERSOS DO USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.....	29
2.4	EFEITOS ADVERSOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	31
2.5	LOCUS CERULEUS E HIPOTÁLAMO	32
2.6	CÓRTEX CEREBRAL: RETROSPLENIAL, MOTOR E SOMATOSSENSORIAL	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVOS GERAIS	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	ANIMAIS	41
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
4.3	COLETA DE AMOSTRAS	43
4.4	METODOLOGIA DA ESTIMATIVA CORTICAL DO CÉREBRO	43
4.5	METODOLOGIA DA ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL.....	44
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DA MORTE CELULAR ATRAVÉS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA (ENSAIO DE TUNEL).....	46
4.7	COLORAÇÃO VON KOSSA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MORTE CELULARPOR MINERALIZAÇÃO CELULAR E TECIDUAL.....	47
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL NO LOCUS CERULEUS	48
5.1.1	Identificação da Morte Celular através de Fragmentação do DNA (Apoptose), no Locus ceruleus	53

5.1.2	Identificação de Morte Celular por Mineralização Celular e Tecidual – Coloração pela Metodologia de Von Kossa, no Locus ceruleus	53
5.2	ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL DO HIPOTÁLAMO.....	59
5.2.1	Identificação da Morte Celular através de Fragmentação do DNA (Apoptose), no Hipotálamo	63
5.2.2	Identificação de Morte Celular por Mineralização Celular e Tecidual – Coloração pela Metodologia de Von Kossa, no Hipotálamo.....	63
5.3	ESTIMATIVA DO VOLUME DO CÓRTEX CEREBRAL: RETROSPLENIAL, MOTOR E SOMATOSSENSORIAL	69
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO.....	107

1 INTRODUÇÃO

Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são uma classe de substâncias farmacológicas, compartilhando uma estrutura de anel esteroide ciclopentafenantreno, que inclui a testosterona e muitos compostos sintéticos estruturalmente relacionados à testosterona. Os efeitos anabólicos dos EAA incluem a promoção da retenção de nitrogênio e crescimento muscular, enquanto os efeitos androgênicos incluem o desenvolvimento de características sexuais secundárias masculinas, como pelos faciais, engrossamento da voz e o crescimento e desenvolvimento da genitália externa (GOLDMAN; POPE; BHASIN, 2019).

Usuários típicos de EAA são do sexo masculino, com idade entre 20 e 40 anos e envolvido em levantamento de peso, musculação, competições de homens fortes ou artes marciais. Uma minoria participa de competições; mas, como a maioria dos abusadores de EAA não é competitiva, o abuso de EAA parece ser motivado internamente, como a ambição de alcançar um corpo mais ideal, ou melhorar a autoestima. Deste modo, o número de usuários de esteroides aumenta a cada ano, não apenas para um perfil característico de indivíduos como supramencionado, mas também por aqueles que estão próximos, sendo motivados ao consumo de esteroides pela expectativa de alcançar um novo nível de desempenho (DE RONDE; SMIT, 2020). O culto ao corpo, a falsa aparência saudável e a perspectiva de se tornar um símbolo sexual, são refletidos nos valores que a sociedade e os meios de comunicação impõem. A obsessão por estes fatores leva os jovens a situações de alto risco e doenças como a anorexia ou bulimia além do uso indevido de esteroides anabolizantes (RIBEIRO, 2001). Dentre os usuários de EAA, sendo a maioria, homens jovens não atletas, estes indivíduos usam essas substâncias para exibirem corpos magros e musculosos; alguns desses homens sofrem de “dismorfia muscular”, uma forma de transtorno dismórfico corporal (GOLDMAN; POPE; BHASIN, 2019).

De acordo com Smit e De Ronde (2018), o EAA é mais frequentemente usado de forma intermitente, ou seja, em ciclos, e o conhecimento dos usuários é baseado em informações de conhecidos, treinadores ou por meio dos veículos de comunicação como as redes sociais e da internet, com isso, o acesso e o método para adquirir os esteroides se tornou mais rápido e ao mesmo tempo muito perigoso. O método abusivo relacionado ao uso de EAA é baseado em doses suprafisiológicas, com variações de 10 a 100 vezes maiores que as indicações terapêuticas. Tais consequências deste uso indiscriminado, tem sido associado a um amplo espectro de efeitos adversos físicos e psíquicos.

Doses suprafsiológicas de testosterona podem ter efeitos neurotóxicos em diferentes tipos de células, incluindo neurônios (BASILE *et al.*, 2013; ESTRADA; VARSHNEY; EHRLICH, 2006; ORLANDO *et al.*, 2007). Altas doses de andrógenos demonstraram contribuir para a neurodegeneração, diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro, aumento da inflamação e diminuição da densidade neuronal em estudos com animais, o que pode corresponder a alterações no humor, cognição e agressão (SCARTH; BJØRNEBEKK, 2021). O uso de EAA em doses suprafsiológicas está associado a anormalidades fisiológicas, cognitivas e cerebrais semelhantes às encontradas em pessoas com provável risco de desenvolver a doença de Alzheimer (DA) e suas demências, que estão associadas a níveis elevados de beta-amiloide cerebral e níveis de proteína tau hiperfosforilada. O início do uso de EAA em doses suprafsiológicas, normalmente ocorre por volta dos 20 anos, e seu acúmulo pode ser acelerado pelo uso de outras substâncias psicoativas, o que é comum entre usuários de EAA sem prescrição e acompanhamento médico. O uso generalizado de EAA em doses suprafsiológicas pode aumentar o número de pessoas que provavelmente desenvolva demência (KAUFMAN *et al.*, 2019).

O uso indiscriminado de EAA pode desenvolver inúmeras patologias nos mais diversos órgãos e sistemas. Seus efeitos adversos são principalmente sobre os seguintes sistemas: reprodutivo, hepático, músculo-esquelético, endócrino, renal, imunológico, cardiovascular, cerebrovascular e nas células sanguíneas. Os efeitos neuropsiquiátrico e comportamental relacionados ao uso abusivo de EAA são bem conhecidos e descritos na literatura. Evidências de pesquisas sugerem que, além dos efeitos psiquiátricos e comportamentais, o uso não médico de EAA carrega potencial neurodegenerativo (POMARA *et al.*, 2015).

Em estudos realizados por Freitas *et al.* (2017), foi possível observar que houve uma diminuição da estimativa de células nervosas do núcleo pálido de camundongos machos quando tratados com Winstrol Depot[®] (estanozolol), e por meio deste resultado foi possível inferir que o uso inadequado e sem orientação médica de EAA pode levar a degenerações celulares. Segundo Kécia Silva *et al.* (2018), o uso de Durateston[®] (testosterona propionato, fenilpropionato de testosterona, testosterona isocaproato, decanoato de testosterona) e Deca-Durabolin[®] (decanoato de nandrolona) reduziram o número de neurônios nas áreas corticais límbica, sensitiva e motora bem como regiões hipocampais Ca1 e Ca2 de camundongos machos. No entanto, o dano causado por Deca-Durabolin[®] foi mais evidente em algumas áreas quando comparado com Durateston[®].

Os dados de Kaufman *et al.* (2015) apontam que as anormalidades detectadas em imagens de ressonância magnética (IMR), em testes realizados em levantadores de peso que

fazem o uso de EAA, podem refletir no aumento da renovação do glutamato e maior vulnerabilidade a processos neurotóxicos ou neurodegenerativos, podendo contribuir para a disfunção cognitiva associada ao uso destes fármacos.

De acordo com os dados obtidos por Zelleroth *et al.* (2019), a testosterona, nandrolona e a trembolona causam efeitos tóxicos por indução de apoptose, ao contrário do estanozolol que, provavelmente, induz necrose. Os dados do estudo sugerem que as interações moleculares dos EAA com o receptor de andrógeno, são os principais responsáveis pelos resultados tóxicos observados.

Diante do exposto, os efeitos causados por esteroides anabolizantes têm afetado a população em geral a cada ano desde sua descoberta. Por conseguinte, seu uso inconsequente está provocando diversos prejuízos físicos e, principalmente, mentais, afetando a atividade, função e desempenho cerebrais dos usuários de EAA, sendo de fato, que a maioria dos danos acometidos, pode ser irrecuperável, tornando-se um grave problema de saúde pública. Em vista disso, o estudo tem por objetivo, realizar uma análise das possíveis alterações quantitativas do número de corpos celulares de neurônios no locus ceruleus (LC) e no hipotálamo, correlacionando as duas estruturas cerebrais. Tendo em vista que suas funções, são essenciais para a manutenção e equilíbrio da mente e do corpo, responsáveis pelos mais complexos mecanismos e ações cerebrais, gerando informações fundamentais para que o corpo possa executar atividades básicas de sobrevivência, como: alimentar, descansar, estar atento e também como se comportar e, principalmente, a capacidade de obter e organizar memórias. Entre outros processos biológicos indispensáveis para a evolução, adaptação fisiológica e metabólica de um organismo. Além de estimar a densidade de neurônios e identificar a possível causa da morte neuronal no LC e hipotálamo, realizará a mensuração do córtex cerebral, em áreas específicas, de ratos machos sob o uso crônico de esteroides anabolizantes androgênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)

Os esteroides anabolizantes foram descritos pela primeira vez pelo fisiologista francês Brown-Séguard em 1889 na França. Após ter praticado medicina nos principais centros de ciências médicas do mundo, Brown-Séguard começou trabalhos com glândulas endócrinas de animais revelando a importância de suas secreções e, em 1889, o fisiologista apresentou à comunidade científica que extratos de testículos de animais serviriam para prolongar e revigorar a vida humana (DE FIGUEIREDO, 2013). Descreveu ter aplicado em si extratos de testículos de cães e porcos, e observou um aumento de força e energia mental; sendo esta a primeira vez onde os esteroides anabolizantes foram referidos (HOBERMAN; YESALIS, 1995).

De acordo com Ganesan, Rahman e Zito (2021), os esteroides anabolizantes (também conhecidos como esteroides androgênicos) são derivados sintéticos da testosterona, classificados em dois tipos: 1) derivados de 17 alfa-alquil, como: oxandrolona, oximetolona e fluoximesterona; 2) derivados de 17 beta-éster, como: cipionato de testosterona, enantato de testosterona, heptilato de testosterona, propionato de testosterona, decanoato de nandrolona, fenpropionato de nandrolona e drostanolona.

Os EAA são derivados da testosterona (hormônio masculino) (HARTGENS; KUIPERS, 2004). Com os estudos de Luseti *et al.* (2015) e Osta (2016), a testosterona e seus derivados se ligam aos receptores androgênicos, onde exercem seus dois efeitos, o anabólico (relacionados ao aumento da massa muscular) e o androgênico (relacionados às características secundárias masculinas).

Nos estudos de Pope *et al.* (2014), a testosterona é metabolizada rapidamente no corpo; no entanto, a esterificação do grupo 17β -hidroxila torna a molécula mais hidrofóbica. Quando esses ésteres de testosterona (como enantato e cipionato de testosterona) são administrados em uma suspensão oleosa, eles são liberados muito lentamente no plasma aquoso devido à sua hidrofobicidade; isso estende a duração de ação destas substâncias. Esses ésteres são facilmente desesterificados em testosterona no corpo. As investigações das relações estrutura-atividade estabeleceram que a remoção do grupo 19-metil aumenta a atividade anabólica. Assim, a 19-nortestosterona (nandrolona) é um EAA potente e um fármaco de treinamento muito popular responsável por um grande número de testes positivos (HOFFMAN *et al.*, 2009).

De acordo com Narayanan *et al.* (2008) e Bhasin *et al.* (2006), as substituições 7 α -alquil da molécula de 19-nortestosterona podem aumentar ainda mais a atividade anabólica para androgênica. As substituições de 17 α -alquil tornam a molécula resistente à degradação; assim, os andrógenos 17 α -alquilados podem ser administrados por via oral.

2.2 USO NO ESPORTE

No ano de 1935, a testosterona foi sintetizada, pela primeira vez, por Ruzica e Weltstein e, em 1939, Boje sugeriu que os hormônios sexuais poderiam aumentar o desempenho atlético (GHAPHERY, 1995). Todavia, o registro histórico do uso de hormônios sexuais no aumento do desempenho em campeonatos mundiais é datado de 1954, quando foram utilizados por atletas russos durante o Campeonato Mundial de Levantamento de Peso, em Viena, na Áustria (WADE, 1972). Em 1964, nas Olimpíadas de Tóquio, os EAA foram largamente utilizados em diversas modalidades (DE ROSE; ACL, 1999). Durante a competição “Mister América”, em 1972, John Grimek estimou que 99% dos atletas estreadores fizeram ou faziam uso de esteroides (YESALIS *et al.*, 1993).

O controle de dopagem para detecção de EAA foi efetuado somente na Olimpíada de Montreal, em 1976. O caso mais conhecido de uso de EAA foi o do corredor canadense Ben Johnson, medalha de ouro nos 100m rasos nas Olimpíadas de Seul, em 1988, cujo exame detectou a presença dos metabólitos do anabolizante estanozolol (YOSHIDA *et al.*, 1994).

González, Hermano e Manso (2000) demonstraram que o decanoato de nandrolona promove o aumento da expressão da proteína do choque térmico hsp72 em fibras musculares de contração rápida, o que contribuiria para o aumento da tolerância do músculo esquelético ao treinamento de alta intensidade. Essa proteína é usualmente sintetizada em resposta ao estresse, inclusive naquele causado pelo exercício físico. Diversos trabalhos sugerem que a testosterona age diretamente na expressão do gene da proteína contrátil em animais, uma vez que esta causa aumento na largura das fibras musculares devido à elevação no número de miofilamentos e miofibrilas, além de induzir mudanças na estrutura das isoformas da miosina de cadeia pesada (CATLIN, 2001).

Os esportistas que fazem uso destas substâncias para melhorar seus rendimentos, acabam, por sua vez, violando os valores fundamentais no esporte. Entretanto, o que mais preocupa são os jovens que fazem uso destas substâncias de forma indiscriminada, com um único objetivo: obter, em um curto espaço de tempo, o corpo perfeito (DARTORA; WARTCHOW; RODRÍGUEZ ACELAS, 2014). A insatisfação com a imagem corporal tem

sido descrita como uma das causas do abuso de EAA, exercendo considerável influência na motivação de homens jovens, que buscam um corpo definido, tomando por base modelos de corpo masculino sugeridos pela mídia, particularmente, em publicações especializadas (CECCHETTO; DE FARIAS; CORRÊA, 2010; MELNIK; JANSEN; GRABBE, 2007).

Entretanto, o abuso dos esteroides anabolizantes passou a ser feito por frequentadores de academias, interessados no aumento da massa magra e na redução da gordura subcutânea (EKLÖF *et al.*, 2003; POPE; KATZ, 1994; WILSON, 1988; YESALIS; WRIGHT; BAHRKE, 1989). Sabe-se que, se o uso abusivo destas substâncias permanecer desta forma, os jovens serão incapazes de ter uma vida saudável (DARTORA; WARTCHOW; RODRÍGUEZ ACELAS, 2014). De acordo com os estudos de Althobiti *et al.* (2018), em estudo feito com 4860 participantes de academia do sexo masculino, com idade média de $28,6 \pm 6,2$, uma porcentagem de 9,8% dos participantes da academia usavam EAA e eram mais propensos a estar envolvidos em hábitos de risco, como tabagismo e abuso de hormônio de crescimento, estavam menos cientes das possíveis complicações dos efeitos causados por estas substâncias, sendo os amigos o principal meio de informação e os treinadores de academia a fonte predominante de EAA.

No atletismo competitivo, no culturismo e nos esportes recreativos os EAA continuam sendo as substâncias mais consumidas (VORONA; NIESCHLAG, 2018). De acordo com Mazzeo (2018), os atletas ainda usam anabolizantes para aumentar o desempenho físico e os fisiculturistas fazem o uso para melhorar o tamanho e a aparência corporal. Com a finalidade de amplificar o desempenho, os anabolizantes geralmente são usados sem interrupção e durante várias semanas que antecedem uma competição. Além disso, método prioritário é “acumular” a ingestão oral e as injeções.

Segundo Ribeiro *et al.* (2021), atualmente, ainda existem muitos atletas que utilizam os esteroides anabolizantes de forma contínua (modelo *Blast and Cruise*). Os modelos clássicos ainda são utilizados em protocolos de uso de esteroides anabolizantes, esses modelos são específicos para duas fases distintas de preparação (a primeira, denominada *Bulk Phase*, onde ocorre o ganho de peso, e a segunda, *Cutting Phase*, específica para pré-competições), estas fases são separadas por um período de “*washout* – reabilitação fisiológica” entre alguns meses, onde os atletas não utilizam anabolizantes e usam programas de *Post Cycle Therapy* (conhecidos como PCT).

2.3 EFEITOS ADVERSOS DO USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES

Os efeitos adversos do uso de EAA podem ocorrer mesmo em dosagens terapêuticas, sendo que uma série de fatores influencia nos benefícios e riscos, tais como: quadro clínico do paciente, histórico familiar, o fármaco usado e sua dosagem e, por fim, sua via de administração (BHASIN *et al.*, 1998). Contudo, a maioria dos efeitos adversos advém do uso indiscriminado, abusivo e não terapêutico, sendo utilizado geralmente por indivíduos que objetivam melhorar a performance esportiva e estética, com dosagens que costumam ultrapassar a dosagem terapêutica em até 100 vezes (HARTGENS; KUIPERS, 2004; WU, 1997).

Em homens, o uso de EAA pode acarretar problemas hormonais, atrofia testicular, sendo que esta poderá progredir e levar à impotência sexual e esterilidade. Poderá também levar ao câncer (principalmente) o de próstata, problemas hepáticos, sem contar o surgimento de acnes, a queda de cabelo levando à calvície, entre outros. Nas mulheres, pode levar a problemas hormonais, menstruais, ginecomastia, engrossamento da voz, câncer, entre outros (DARTORA; WARTCHOW; RODRÍGUEZ ACELAS, 2014).

Segundo Albano *et al.* (2021), a administração a longo prazo de doses elevadas de esteroides anabolizantes, podem levar a consequências graves, como hipogonadismo, comprometimento cardíaco, neurodegeneração, doença arterial coronariana e morte súbita cardíaca. Além disso, os efeitos adversos de longo prazo mais relatados afetam o sistema cardiovascular, como cardiomiopatia e doença aterosclerótica.

De acordo com a literatura, foi constatado que quase 100% dos usuários de esteroides anabolizantes apresentavam algum efeito adverso. Dentre eles, os mais comuns são acne, atrofia testicular, retenção hídrica, alterações do humor e ginecomastia (HARTGENS; KUIPERS, 2004; PARKINSON; EVANS, 2006). Além disso, existem grandes alterações das variáveis bioquímicas com o uso dos esteroides anabolizantes, alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, enzimas hepáticas, células do sistema hematopoiético e perfil lipídico sanguíneo, repetidas vezes referido como fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares (VENÂNCIO *et al.*, 2010). Esses efeitos ainda podem ser somados a outros fatores, tais como: o tipo de EAA; via de aplicação (via oral, injetável e adesivo transdérmico); a dosagem, que normalmente é dose-dependente; a idade, como no caso de adolescentes em que pode ocorrer fechamento prematuro das epífises; o sexo dos usuários; predisposição genética entre outros (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; WU, 1997).

Um estudo realizado em fisiculturistas revelou baixa informação sobre os EAA. Entre os efeitos colaterais mais conhecidos, foram: impotência sexual em 10,7% e perda da libido em

8,1%. Tais dados sugerem que esse efeito adverso atinge a grande maioria desses atletas, devido, principalmente, ao uso prolongado de EAA (SANTOS; DA ROCHA; DA SILVA, 2011). Nas mulheres, alguns efeitos colaterais são irreversíveis: hipertrofia do clitóris, aumento de pelos na face e corporal e mudança no timbre de voz. Não se pode esquecer que os EAA são derivados sintéticos da testosterona; logo, a mulher adquire características sexuais masculinas (FERREIRA *et al.*, 2007; HOFFMAN; RATAMESS, 2006; IP *et al.*, 2010).

Segundo Davani-Davari, Karimzadeh e Khalili (2019), os EAA provavelmente afetam os rins em diferentes aspectos; podem induzir ou agravar lesão renal aguda, doença renal crônica e toxicidade glomerular. Os efeitos adversos provocados pelos anabolizantes são mediados por vias como estimulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento da produção de endotelina, produção de espécies reativas de oxigênio, superexpressão de mediadores pró-fibróticos e pró-apoptóticos (citocinas inflamatórias, como: TNF- α , IL-1b e IL-6).

De acordo com Pope *et al.* (2014) e De Ronde e Smit (2020), o uso de esteroides anabolizantes orais está associado à toxicidade hepática. No entanto, a tímida elevação de Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST), frequentemente, encontrada em usuários de esteroides, reflete, principalmente, o dano muscular resultante do treinamento intensivo com pesos, conseqüentemente, o aumento da massa e força muscular resultante do abuso de EAA pode resultar em lesões como ruptura de tendão, hérnia lombar e sobrecarregadas nas articulações. Schwingel *et al.* (2011), demonstraram aumentos estatisticamente significativos dos níveis de algumas enzimas que estão relacionadas à toxicidade no fígado, como ALT e AST no grupo usuário de EAA em comparação ao grupo não usuário. Os riscos para problemas hepáticos parecem estar relacionados, principalmente, ao uso abusivo de EAA orais (17 α -alquilados), por serem mais tóxicos e resistentes ao metabolismo hepático (HOFFMAN; RATAMESS, 2006).

Os estudos de Carmo *et al.* (2011) verificaram que o uso de EAA associado ao treinamento aeróbio em ratos promoveu adaptações negativas no sistema cardiovascular, como a hipertrofia cardíaca patológica, caracterizada pela diminuição da função diastólica. Além desses efeitos negativos, os EAA parecem inibir alguns dos efeitos positivos do exercício sobre o sistema cardiovascular, como a diminuição de frequência cardíaca em repouso.

Segundo Jerônimo *et al.* (2019), camundongos machos tratados com Deposteron[®] mostraram um aumento significativo ($p < 0,001$) no ventrículo esquerdo em diâmetro em relação ao grupo controle e o grupo tratado com Winstrol[®] ($p < 0,01$). Em animais fêmeas, os resultados mostraram que o grupo tratado com Winstrol[®] apresentou uma significativa

diminuição do diâmetro ventricular ($p < 0,01$) em relação aos grupos controle e Deposteron[®], concluindo que o uso de doses suprafsiológicas de EAA administrado significativamente de forma diferente, altera o diâmetro ventricular tanto em animais machos como em animais fêmeas.

De acordo com Perry *et al.* (2020), o uso abusivo de EAA provavelmente está associado a doenças cardiovasculares (DCV), em particular, a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), arritmias cardíacas e doença arterial coronariana (DAC), em síntese, os indivíduos que fazem em uso de esteroides anabolizantes desenvolveram fatores de risco para DCV, como pressão arterial elevada e dislipidemia, como se não bastasse, apresentavam risco de desenvolver cardiomiopatia e alteração da coagulação.

2.4 EFEITOS ADVERSOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Algumas alterações psicológicas relacionadas ao uso abusivo de EAA são observadas, tais como: aumento da agressividade, irritabilidade, depressão, mania e psicoses. Estudo randomizado, duplo cego, descreveu elevações nos índices do Questionário de Agressão de Buss e Parry ($p = 0,002$) e na Escala de Avaliação de Mania para Jovens ($p = 0,03$) após 12 semanas de administração suprafsiológicas de cipionato de testosterona, pelo período de seis semanas, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, segundo os autores, esses efeitos não foram uniformes entre os grupos analisados e necessitam de melhor análise e detalhes para sua compreensão (POPE; KOURI; HUDSON, 2000).

A utilização dos EAA estão associados com sintomas psiquiátricos, incluindo aumento da agressividade, bem como com disfunção cognitiva (KAUFMAN *et al.*, 2015). As doses suprafsiológicas deste derivado sintético da testosterona têm sido associadas a muitos efeitos adversos físicos e psiquiátricos, particularmente episódios de impulsividade e comportamento agressivo (AMBAR; CHIAVEGATTO, 2009).

De acordo com Damião *et al.* (2012) e Lima *et al.* (2018), houve alterações significativas na densidade neuronal no córtex cerebral e hipotálamo lateral de animais tratados com diferentes tipos de esteroides anabolizantes, podendo chegar a uma redução de 38% no número de células nervosas quando comparados aos animais do grupo controle.

Em concordância com Ribeiro *et al.* (2019), os resultados obtidos nas análises quantitativas mostraram que o cipionato de testosterona e estanozolol em doses suprafsiológicas são capazes de causar uma redução significativa no número de células na amígdala basolateral (BLA) e da região do núcleo ventral posterior (VPN) da amígdala medial

de camundongos. Esses resultados, somados aos resultados do comportamento, podem estar relacionados diretamente à ansiedade e estimular respostas comportamentais negativas.

Segundo os estudos realizados por Hauger *et al.* (2019), os usuários do sexo masculino dependentes de esteroides anabolizantes androgênicos, parecem ter um córtex mais fino em regiões comuns, especificamente em regiões: frontal (incluindo área pré-frontal), temporal, parietal e occipital.

Em seu estudo, Bjørnebekk *et al.* (2019) mostraram que levantadores de peso expostos ao EAA tiveram desempenho significativamente pior em vários domínios cognitivos, independentemente da idade, educação, QI verbal e exposição a drogas clássicas de abuso quando comparados com aqueles que não fizeram uso de tais substâncias.

Estudos de Damião *et al.* (2021) mostram os efeitos causados pelas doses supra-fisiológicas de estanozolol e cipionato de testosterona, revelando que estes esteroides podem causar consideráveis danos ao tecido nervoso, comprometendo a estrutura comportamental, sugerindo até que tais lesões podem induzir à perda de eficiência e desempenho, bem como, distúrbios de comportamento, tanto em atletas quanto em não atletas, e, eventualmente, causar danos irreparáveis aos indivíduos que fazem uso ilegal, sem prescrição e suporte médico.

De acordo com Hutchins e Barger (1998), a morte celular por uso de EAA de forma indiscriminada ocorre por apoptose, no entanto, podendo também ser processada por necrose. Segundo Wiegert e Bading (2011) e Subramaniam *et al.* (2004), a sobrecarga de cálcio na célula pode ativar a via ERK (quinases extracelulares reguladas por sinal), na qual é necessário a translocação das vias ERK 1/ 2, para o núcleo, desencadeando o mecanismo prejudicial na necrose neuronal.

2.5 LOCUS CERULEUS E HIPOTÁLAMO

O locus ceruleus (LC) é o principal núcleo noradrenérgico do cérebro, e sua degeneração é considerada chave na patogênese das doenças neurodegenerativas (GALGANI *et al.*, 2021). O LC é um núcleo no assoalho lateral do quarto ventrículo e da ponte dorsolateral superior. A norepinefrina (NE), ou, também denominada de noradrenalina (NA), é um neurotransmissor predominantemente liberado do locus ceruleus. A norepinefrina ajuda a promover a formação e o fortalecimento de memórias, especialmente aquelas criadas em situações estressantes. A NA liberada do LC, pode atuar em receptores adrenérgicos (receptores alfa e beta) presentes em neurônios e células gliais (oligodendrócitos, astrócitos, células endoteliais, células de

Schwann, micróglia e células satélites) através das vias da adenilil ciclase e da fosfolipase C. A NA também pode ativar o metabolismo do glicogênio e a sinalização do cálcio nos astrócitos, bem como regular o fluxo sanguíneo e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (FERRUCCI *et al.*, 2013). De acordo com Kelly *et al.* (2017), NA é um modulador chave dos processos de aprendizagem; assim, a alteração do sistema LC-NA poderia dificultar a formação da memória.

Segundo Benarroch (2018), o locus ceruleus contém neurônios sintetizadores de norepinefrina que enviam projeções difusas por todo o sistema nervoso central (SNC). O sistema locus ceruleus/norepinefrina (LC-NE) tem um papel importante na excitação, atenção e respostas ao estresse. No cérebro, a NE também pode contribuir para plasticidade sináptica em longo prazo, modulação da dor, controle motor, homeostase energética e controle do fluxo sanguíneo local. O LC é severamente afetado em distúrbios neurodegenerativos, incluindo a doença de Parkinson. A sinalização noradrenérgica anormal também pode contribuir potencialmente para as manifestações motoras da doença.

Os neurônios do locus ceruleus são na sua maioria ramificados e não mielinizados. Algumas das áreas que fornecem informações para o LC são: córtex pré-frontal medial, o hipotálamo, o núcleo paragigantocelular e o nucleus prepositus. O locus ceruleus fornece saída para o hipocampo, medula espinal, hipotálamo e amígdala. Os neurônios noradrenérgicos fazem a inervação de áreas do cérebro que auxiliam na manutenção de algumas funções como: memória, atenção e o ciclo sono-vigília (SAMUELS; SZABADI, 2008b; TREDICI; BRAAK, 2013; VAN DIJK *et al.*, 2012).

De acordo com os estudos de Khroud, Reddy e Saadabadi (2021), as anormalidades do locus ceruleus têm implicações contribuintes para advir processos neuropsiquiátricos e também neurodegenerativos. A degeneração dos neurônios no locus ceruleus foi postulada como contribuinte para o desenvolvimento de doenças que afetam o cérebro, como exemplo, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. De acordo com a literatura, a degeneração de neurônios do LC, resulta no aumento dos depósitos de proteína beta-amiloide no cérebro, além disso, a proteína beta-amiloide é um componente das placas amiloides, formando-se por meio de depósitos de seus fragmentos.

O hipotálamo é formado por um conjunto bilateral de núcleos, divididos em três zonas que circundam o terceiro ventrículo e os corpos mamilares. Está localizado centralmente no cérebro, conectado ao tronco cerebral através do fascículo longitudinal dorsal, córtex cerebral através do feixe prosencefálico medial, o hipocampo através do fórnice, amígdala através da

estria terminal, tálamo através do trato mamilotalâmico, hipófise através da eminência mediana, e retina através do trato retino-hipotalâmico (BEAR; REDDY; BOLLU, 2021).

De acordo com Swanson e Lichtman (2016), o hipotálamo é o principal responsável pela hierarquia motora que inclui importantes áreas cerebrais, como: córtex cerebral, sistema límbico, tronco cerebral e os neurônios motores da medula espinhal. Além disso, tem a capacidade de integrar informações internas e externas sobre a orientação do organismo e direciona os padrões de ações para manter a homeostase ao longo da vida. As áreas sensoriais do córtex cerebral fornecem percepções sensoriais abstratas. O sistema límbico fornece estímulos emocionais potentes, o trato espino-hipotalâmico fornece informações sobre dor e temperatura. O tronco cerebral fornece serotonina e norepinefrina. Deste modo, o hipotálamo faz a integração desses estímulos e possui a capacidade de ativar padrões de ações e posturas no córtex cerebral e no tronco cerebral, assim, esses sinais comunicam-se da coluna até os músculos produzindo comportamentos.

Dentre as funções exercidas pelo hipotálamo, como: endócrinas, autonômicas e comportamentais, mas também, aquelas que são exercidas pelos seus núcleos, que contém coleções neuronais distintas produzindo neuropeptídeos e neurotransmissores que regulam funções corporais essenciais, incluindo temperatura, taxa metabólica, sede e fome, comportamento sexual e reprodução, ritmo circadiano e respostas emocionais (BIRAN *et al.*, 2015). Salienta-se ainda que o hipotálamo, mais especificamente, hipotálamo lateral (região de projeção em todo o cérebro tradicionalmente conhecida como sensor de nutrientes e controlador de excitação e motivação), também é fundamental para atualizar muitos tipos de memórias associativas e não associativas, também podendo atuar como uma interface para vários tipos de funções cognitivas, como aprendizado e memória (BURDAKOV; PELEG-RAIBSTEIN, 2020).

De acordo com Burdakov e Peleg-Raibstein (2020), aprendizagem e memória são elementos essenciais para vários processos biológicos, que são fundamentais para a sobrevivência de um organismo. Desta forma, a decisão de comer envolve uma análise de informações metabólicas internas e das condições ambientais externas durante um determinado período de tempo. Isso se torna evidente, quando um sujeito está decidindo que tipo de alimento deseja comer, que vai depender do tipo de alimento que o organismo necessita, assim, decidirá do que se alimentar e como selecionar esses alimentos, por meio de dados processados em seu organismo diferenciando quais alimentos possuem nutrientes fundamentais para sua existência. Diante disso, sugere-se que o hipotálamo ou regiões semelhantes ao hipotálamo, desempenham funções imprescindíveis na regulação de diversos tipos de aprendizado e memória, relacionados

ou não aos alimentos. Explorando também, que a excitação e a motivação são pré-requisitos indispensáveis para atualizar muitos tipos de memórias, visto que a atualização da memória, geralmente dependente de experiência e requer motivação para realizar determinadas ações, assim como, explorar um objeto novo.

Deste modo, os estudos sugerem que o desenvolvimento e a formação de memória pelo hipotálamo, possivelmente está relacionado aos sinais hipotalâmicos, representando estados de energia, excitação ou motivação, que atuam como entradas críticas para locais de plasticidade sináptica, que permitem (de forma aguda ou crônica via “marcação sináptica”) ou criam diretamente mudanças nos pesos sinápticos e, assim, formação da memória de acordo com a energia e o estado cerebral (BURDAKOV; PELEG-RAIBSTEIN, 2020; REDONDO; MORRIS, 2011).

Deste modo, a degeneração do hipotálamo está associada a vários tipos de doenças neurológicas, como: Doença de Alzheimer (DA), Doença de Huntington (DH), Demência Fronto-Temporal (DFT), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), que afetam drasticamente a qualidade de vida do indivíduo em diversos aspectos. Sintomas e sinais, como: alterações metabólicas, perda de peso, perturbações endócrinas, humor anormal e comportamento alterado, muitas dessas características, podem ser causadas por danos ao hipotálamo, muitas das vezes, estes danos podem ser causados de diversas maneiras, sendo que o hipotálamo é um elemento importante de comunicação entre o sistema nervoso central e o ambiente (VERCRUYSSSE *et al.*, 2018).

As fibras eferentes originárias do LC atingem as estruturas do prosencéfalo através de dois feixes noradrenérgicos: ventral e dorsal. Essas vias neurais percorrem o mesencéfalo, alcançando o prosencéfalo e distribuindo-se amplamente em suas estruturas; em conformidade com estudos de lesão, a maioria das fibras noradrenérgicas chegam ao hipotálamo através do feixe noradrenérgico dorsal, demonstrando as conexões relacionadas entre o hipotálamo e o locus ceruleus (GIORGI *et al.*, 2021; SAMUELS; SZABADI, 2008a; SZABADI, 2013).

De acordo com Giorgi *et al.* (2021), o hipotálamo e o LC compartilham várias funções, pois ambos participam da regulação do ciclo sono/vigília e da modulação das atividades autonômicas e homeostáticas. Essas interações ocorrem devido às conexões anatômicas densas e complexas que ligam as duas estruturas cerebrais. O locus ceruleus envia projeções específicas para o hipotálamo e, por meio delas, modula uma variedade de funções hipotalâmicas. Além disso, alguns estudos humanos *post-mortem* sugerem que a degeneração do sistema locus ceruleus/noradrenérgico também pode promover processos degenerativos em várias regiões do cérebro, incluindo o hipotálamo. Dessa maneira, dentre as funções

consideradas controladas pelo hipotálamo, evidencia-se de que a degeneração de LC/NA é suficiente por si só para induzir: redução da liberação de gonadotrofina, hiporexia e redução da ingestão alimentar, comprometimento da regulação da pressão arterial (PA), alterações na motilidade gastrointestinal e alterações significativas do ciclo sono-vigília.

Deste modo, é evidente que o locus ceruleus e o hipotálamo, são elementos complexos, com características e habilidades essenciais para o desenvolvimento e domínio mental e físico. Estão intimamente conectados por uma rede neuronal de extrema importância, com funções e comportamentos fundamentais, a fim de garantir as necessidades básicas para corpo humano, sendo elementos importantes de equilíbrio e existência, entre a mente, o corpo e o ambiente. A degeneração neuronal pode ser ocasionada de diversas maneiras, podendo ser induzida ou espontânea, que vai depender de inúmeros fatores associados a vida do indivíduo.

2.6 CÓRTEX CEREBRAL: RETROSPLENIAL, MOTOR E SOMATOSSENSORIAL

O córtex retrosplenial é uma região dentro do sistema neocortical posterior, fortemente interconectado com uma série de redes cerebrais, tanto corticais quanto subcorticais. Deste modo, esta área está engajada por uma infinidade de funções cognitivas, apesar de ainda não haver um acordo em relação a sua precisa função. Estudos em humanos e também em animais indicam evidências em seu papel na cognição espacial, possui importantes conexões corticais e subcorticais. Sua localização central, evidencia sua importância por estar em uma posição mediana, sendo fundamental para receber informações e influenciar prontamente regiões-chave do cérebro, que são essenciais para o processamento de informações espaciais. Além disso, estudos apontam que a área esquerda do córtex, possivelmente está relacionada na memória episódica geral, enquanto que a direita no processamento espacial (MITCHELL *et al.*, 2018).

De acordo com Milkzarek e Vann (2020), o córtex retrosplenial humano e de macaco envolve o aspecto caudal do esplênio do corpo caloso enquanto em roedores, está localizado dorsalmente e abrange quase metade do comprimento do cérebro. É subdividido em regiões granulares e disgranulares, correspondendo às áreas de Brodmann 29 e 30, respectivamente. Apesar das diferenças na localização e tamanhos relativos, em primatas e roedores exibe propriedades citoarquitetônicas semelhantes e compartilha conectividade homóloga com outras regiões.

Segundo Vann, Aggleton e Maguire (2009), é evidente que o córtex retrosplenial é uma área importante de uma rede central de regiões cerebrais que sustentam uma série de funções cognitivas, como: memória episódica, navegação, imaginação e planejamento para o futuro,

além disso, também é evidente que seu comprometimento está relacionado a distúrbios neurológicos mais comuns que causam danos a memória. De acordo com Todd, Fournier e Bucci (2019), o córtex retrosplenial auxilia a navegação espacial, bem como a aprendizagem contextual e a memória, e crescentes pesquisas sugerem que o córtex retrosplenial também contribui para o aprendizado e a memória para pistas discretas, como estímulos auditivos ou visuais.

Estudos em pacientes com lesão retrosplenial unilateral sugerem importante contribuição relacionada à navegação, enquanto a lesão bilateral é frequentemente associada à amnésia anterógrada e em graus variados de amnésia retrógrada, também há evidências consistentes de que o córtex retrosplenial sofre alterações patológicas bem precoces na progressão do comprometimento cognitivo leve a na Doença de Alzheimer (DA), que são reflexos por uma queda na atividade metabólica. Também há evidências que os padrões de atividade do córtex retrosplenial possivelmente estão relacionados a uma função essencial na construção de cena, no processo de geração e manipulação mental, em uma cena complexa ou coerente, portanto, este processo pode amparar funções como: memória autobiográfica, navegação e pensamento sobre futuro (VANN; AGGLETON; MAGUIRE, 2009).

O córtex cerebral é a porção mais externa do cérebro, no qual contém bilhões de corpos celulares de neurônios compactados formando a substância cinzenta do cérebro. O córtex motor primário é responsável por controlar os movimentos voluntários de partes específicas do corpo (EL-BABA; SCHURY, 2021). No córtex motor primário estão os neurônios motores superiores. O neurônio motor inferior é responsável por transmitir o sinal do neurônio motor superior para o músculo efetor para realizar um movimento (ZAYIA; TADI, 2022). As regiões motoras do córtex cerebral estão localizadas predominantemente no lobo frontal, anterior ao sulco central, e incluem o córtex motor primário (encontrado no giro pré-central) e o córtex pré-motor, que inicia e regula o movimento voluntário (JAVED; REDDY; LUI, 2019). Os neurônios motores compreendem vários circuitos complexos e rigidamente controlados em todo o corpo que permitem movimentos voluntários e involuntários por meio da inervação de músculos e glândulas efetoras (ZAYIA; TADI, 2022).

O córtex pré-frontal é conhecido por ser o centro de associação de ordem superior do cérebro, pois é responsável pela tomada de decisões, raciocínio, expressão da personalidade, manutenção da adequação social e outros comportamentos cognitivos complexos (EL-BABA; SCHURY, 2021).

De acordo com os estudos de Zayia e Tadi (2022), os neurônios motores superiores originam-se no córtex cerebral e descem até o tronco cerebral ou medula espinal, enquanto os

neurônios motores inferiores começam na medula espinal e passam a inervar músculos e glândulas por todo o corpo. Também existem os neurônios motores branquiais, que inervam músculos da cabeça e pescoço, originados dos arcos branquiais; neurônios motores somáticos, que estão localizados no tronco cerebral, que são divididos em: alfa, beta e gama; e os neurônios motores viscerais, que participam das funções simpáticas e parassimpáticas do sistema nervoso autônomo. De acordo com Kumar, Manning e Ostry (2019), é possível que o córtex motor possa desempenhar um papel maior na consolidação de aprendizagem em habilidades motoras explícitas, como o aprendizado em sequência, e uma função reduzida no aprendizado de adaptação motora. Segundo Pirau e Lui (2022), lesões e danos nas áreas motora primária, motora suplementar e pré-motora ocasionam à fraqueza e à execução prejudicada das tarefas motoras do lado contralateral.

De acordo com Raju e Tadi (2022), o sistema nervoso somatossensorial é responsável por receber as informações e sensações por todo o corpo, por meio dos dermatômeros, este sistema, serve como condutor entre as distintas modalidades sensoriais do corpo, enviando informações da periferia para o giro pós-central e córtices associados, transmitindo e conectando o corpo com o ambiente circundante, realizando trocas de informações. Mecanorreceptores periféricos, quimiorreceptores, termorreceptores e nociceptores são responsáveis por transmitirem informações através de fibras nervosas específicas adentram os tratos do SNC seguindo na direção do cérebro, deste modo, cada receptor possui uma modalidade única de sensação, assim, esses sentidos são processados e integrados ao SNC auxiliando na interação do corpo com os estímulos ambientais.

Estruturalmente o córtex somatossensorial é dividido em dois: córtex somatossensorial primário (SI) e o córtex somatossensorial secundário (SII), que estão localizados no lobo parietal cerebral, com isso, a dinâmica de suas associações está no córtex SII auxiliar a processar as informações sensoriais entregues ao córtex SI (RAJU; TADI, 2022). As áreas somatossensoriais podem desempenhar um papel na consolidação da memória armazenando estados sensoriais recém-aprendidos que orientam os movimentos subsequentes e resultam em melhorias na acuidade somática (KUMAR; MANNING; OSTRY, 2019). Segundo Friedrich, Mückschel e Beste (2018), os córtex somatossensoriais (SI e SII), são conhecidos por diferirem em suas conexões neuroanatômicas com áreas pré-frontais, bem como em seu envolvimento para codificar aspectos cognitivos do processamento tátil.

A plasticidade no córtex somatossensorial pode refletir a aquisição e armazenamento de estados sensoriais recém-aprendidos (novos alvos somáticos) que orientam os movimentos subsequentes, e se assim for, a supressão ou interrupção da atividade do córtex somatossensorial

após o aprendizado deve bloquear a consolidação da memória e afetar adversamente a retenção da memória motora. A plasticidade neuronal relacionada à aprendizagem pode ser observada no córtex somatossensorial, portanto, possivelmente está envolvida na consolidação da memória, e que se direcionar uma estimulação cerebral, isto, pode ser usado para suprimir regiões corticais individuais para avaliar seu envolvimento na consolidação da memória. Alterações que envolvem a aprendizagem no córtex somatossensorial estão conectadas na consolidação inicial da memória motora (KUMAR; MANNING; OSTRY, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estimar o volume cortical bem como a densidade do número de corpos celulares de neurônios no locus ceruleus e hipotálamo de animais machos expostos ao uso crônico dos anabolizantes Deposteron[®] (Cipionato de Testosterona) e Deca Durabolin[®] (Decanoato de Nandrolona) submetidos ou não exercício físico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar quantitativamente os corpos celulares de neurônios no locus ceruleus e hipotálamo;
- b) Determinar, o provável, tipo de morte celular que ocorreu nas áreas analisadas;
- c) Estimar o volume do córtex cerebral (áreas: retrosplenial, motora e somatossensorial) nos grupos experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

As amostras que foram utilizadas neste projeto, fazem parte do acervo que está atualmente lotado no Departamento de Anatomia da Unifal-MG e foram coletadas de um projeto de doutorado do discente Bruno Damião do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, o qual conta com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-Unifal-MG) sob registro nº 18/2016 (ANEXO A).

Para este trabalho utilizou-se cortes de cérebros de 70 ratos Wistar machos distribuídos em 14 grupos com 05 animais cada. Os animais são provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e foram alocados em caixas com dois animais, contendo água e ração *ad libitum*, em um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Não houve perda de animais ao longo do delineamento experimental (DO CARMO *et al.*, 2011; GRÖNBLADH *et al.*, 2013; TANEHKAR *et al.*, 2013).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento foram utilizados dois esteroides anabolizantes: Cipionato de Testosterona (comercializado no Brasil como Deposteron[®], caixa com 3 ampolas de 200 mg/mL cada) e Decanoato de Nandrolona (Deca-Durabolin[®], nome comercial no Brasil, caixa com uma ampola de 50 mg/mL). Para comparação do efeito dos tratamentos foram utilizados 10 animais, dos quais foram formados dois grupos: Controle com exercício (CE): 5 animais e Controle Sedentário (CS): 5 animais. Para os grupos controles, foram realizadas aplicações de cloreto de sódio 0,9% (popularmente conhecido como soro fisiológico). As aplicações foram executadas de forma subcutânea, paralelamente, aos dias e horários em que realizavam as aplicações dos grupos tratados.

Os dois anabolizantes utilizados no experimento, representam duas das três classes de esteroides sintéticos produzidos pelas indústrias farmacêuticas (BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001; CLARK; HENDERSON, 2003; SHAHIDI, 2001). Ao longo do texto, os esteroides anabolizantes são referidos com suas respectivas abreviações, sendo Cipionato de Testosterona (DP) e Decanoato de Nandrolona (DC) (TABELA 1).

Tabela 1 – Número de animais e grupos de estudos

EAA/DOSES	CIPIONATO DE TESTOSTERONA		DECANOATO DE NANDROLONA	
	Exercício	Sedentário	Exercício	Sedentário
5 mg/ kg	5	5	5	5
10 mg/ kg	5	5	5	5
15 mg/ kg	5	5	5	5
CONTROLE	SEDENTÁRIO / EXERCÍCIO			
	5		5	
TOTAL	70 Animais divididos em 14 Grupos de 5 Animais			

Fonte: Autores (2021).

As doses utilizadas (5, 10 e 15 mg/kg), foram aplicadas de forma subcutânea, duas vezes na semana (segunda-feira e quinta-feira), durante 8 semanas, totalizando 16 aplicações por animal. O trabalho de Pope e Katz (1988) é base para boa parte das dosagens utilizadas nos trabalhos com anabolizantes, como Norton, Trifunovic e Woodiwiss (2000), Do Carmo *et al.* (2011), Tanekar *et al.* (2013) e Camiletti-Mourón *et al.* (2015).

O protocolo de treinamento dos animais deste estudo foi realizado em um trabalho de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como citado anteriormente, no qual, foi baseado no trabalho de Cassilhas *et al.* (2013); o aparato escolhido para modelo de exercício resistido foi a Escada Vertical a 80 graus de inclinação. Esse aparato consiste de uma escada com 110 cm de altura, 18 cm de largura e espaço de 2 cm entre cada degrau, com uma inclinação de 80 graus. No topo da escada contém uma câmara (20x20x20cm) que foi utilizada para descanso dos animais entre as séries do exercício. O treinamento resistido ocorreu durante as 8 semanas de tratamento, 3 vezes na semana (segunda, quarta e sexta-feira), totalizando 24 sessões de treinamento.

A familiarização dos animais à escada ocorreu durante três dias consecutivos. Antes da primeira etapa, o animal foi colocado na câmara no topo da escada por 60 segundos, tempo necessário para reconhecer o ambiente como não perigoso. A primeira etapa consistiu em colocar o animal na porção proximal da escada, a 35 cm da porta de entrada da câmara (“área segura”). Na segunda etapa, o animal foi colocado no meio da escada, cerca de 55 cm da entrada da câmara e na terceira etapa na base da escada, 110 cm da câmara. A terceira tentativa dos 3

dias foi medida, em segundos, e uma redução no tempo de subida indicou um aprendizado do padrão.

O protocolo de treinamento começou 3 dias após o período de adaptação e consistiu de 8 subidas na escada com peso extra crescente, com intervalo de 60 segundos entre cada subida. Cada série contou com uma média de 8 a 12 repetições por parte do animal, sendo movimentos repetitivos feitos para subir a escada. Nas duas primeiras séries o peso extra foi equivalente a 50% do peso corporal do animal, subindo para 75% na terceira e quarta série, 90% na quinta e sexta e 100% nas duas últimas (sétima e oitava).

O peso extra foi colocado dentro de um tubo Falcon acoplado à porção proximal da cauda do animal por uma fita não adesiva da 3M, evitando assim ferimentos ou resquícios de cola após término do exercício.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS

Os encéfalos foram lavados com soro fisiológico e colocados em frascos de vidro contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. Todos permaneceram nesta solução por 24 horas, seguindo para processamento histológico de rotina (RABINOWICZ *et al.*, 2002).

Os encéfalos que seguiram para análise histológica foram divididos por secção frontal, em uma porção anterior, uma porção posterior e uma porção contendo o tronco encefálico e o cerebelo. Estes foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina (RIBEIRO *et al.*, 2019). As lâminas foram obtidas em cortes seriados de 7 micrômetros, com um micrótomo Lupe[®]. As lâminas obtidas foram coradas com violeta cresil para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar marcar forte e individualmente cada célula para contagem (DAMIÃO *et al.*, 2012; KÉCIA SILVA *et al.*, 2018).

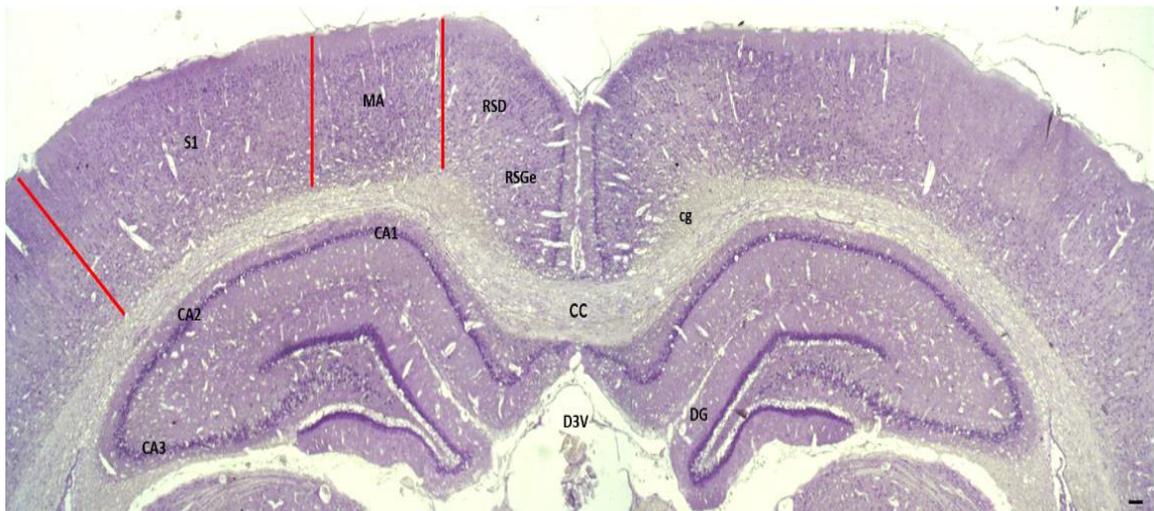
4.4 METODOLOGIA DA ESTIMATIVA CORTICAL DO CÉREBRO

Para realizar a análise das áreas corticais dos cérebros dos animais sob os efeitos dos esteroides anabolizantes, foram estudadas 3 áreas: retrosplenial, motora e sensitiva (FIGURA 1). Deste modo, para obtenção dos dados morfométricos referentes a espessura cortical do

cérebro, foi adaptada a metodologia utilizada por Dahnke, Yotter e Gaser (2013), Fischl e Dale (2000), Rowley *et al.* (2015) e Scott e Thacker (2005).

Para este estudo foram selecionados cinco (5) cortes de todos os cérebros, destes cinco cortes obtidos, foram analisados, aleatoriamente, 6 áreas sendo 3 áreas do lado direito e 3 áreas do lado esquerdo. A mensuração foi realizada ao microscópio de luz com aumento de 2,5x. Para a análise foi utilizado o software Axiovision Rel. 4.8.2 e Axiovision 4 Module Interactive Measurement da marca Carl Zeiss.

Figura 1 – Fotomicrografia do córtex cerebral de rato, identificação das áreas corticais em estudo e suas delimitações.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Fotomicrografia do córtex cerebral de rato. As linhas vermelhas representam as delimitações entre as áreas: retrosplênica, motora e somatossensorial. Córtex Retrosplênico (RSGe e RSD); Córtex da Associação Motora (MA); Córtex Somatossensorial Primário (S1); Cíngulo (cg); Corpo Caloso (CC); Giro Denteado (DG); III Ventrículo Dorsal (D3V); Áreas do Hipocampo (CA1, CA2 e CA3). Aumento de 2,5x. Coloração Violeta Cresil.

4.5 METODOLOGIA DA ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL

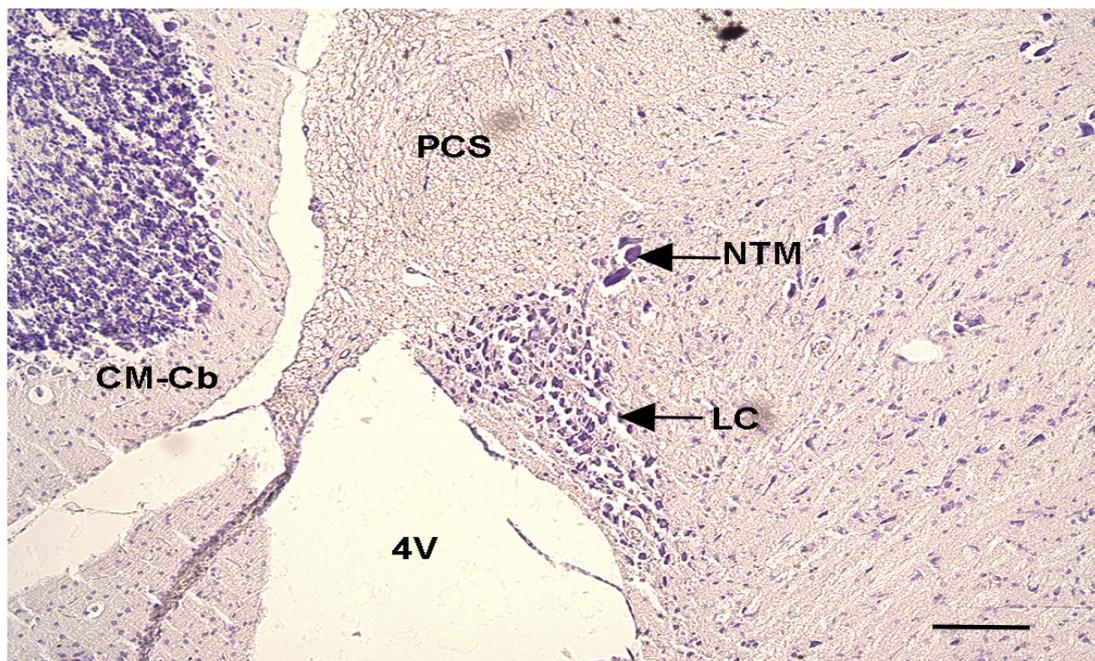
Para a localização do locus ceruleus (FIGURA 2) e do hipotálamo (FIGURA 3), foi utilizado como referência o atlas de Paxinos e Watson (2007).

Para esta análise foi aplicada a técnica de Contagem Aleatória Simples (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Foram utilizadas as metades posteriores dos cérebros. Nas quais foram feitos 10 (dez) cortes. Destes foram selecionados 5 (cinco) para serem analisados. Em seguida foram capturados 2 (dois) campos microscópicos aleatórios tanto do lado direito como do lado esquerdo totalizando assim 20 áreas que foram então analisadas.

A Contagem Aleatória Simples foi realizada utilizando um quadrado denominado “*counting frame*” (ou área teste) medindo $9,50 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. Nesta foram marcados somente os corpos celulares de neurônios que se encontravam dentro da área delimitada incluindo aqueles sobre as linhas tracejadas (verde) e excluídos aqueles que estavam fora da área delimitada e sobre as linhas contínuas (vermelha).

A análise foi feita por um Sistema de Analisador de Imagens Axiovision 4 Module Interactive Mensuement da marca Carl Zeiss® acoplado a um microscópio AxioScope A1, também da marca Carl Zeiss® e um computador. As imagens foram capturadas em um aumento de 40x.

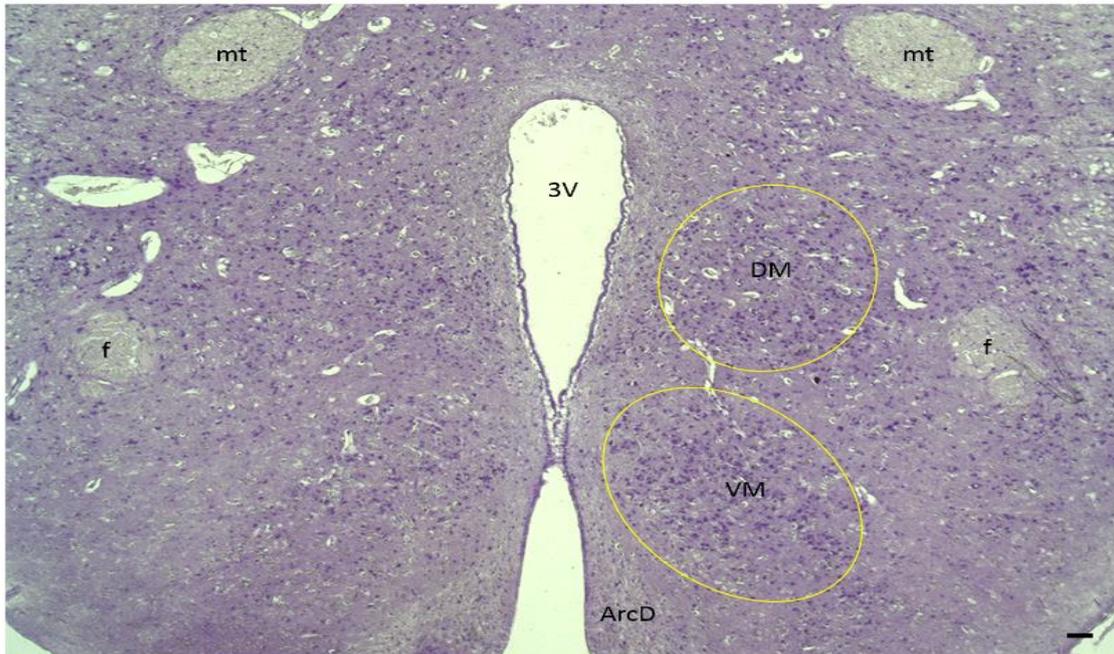
Figura 2 – Fotomicrografia do tronco cerebral de rato, identificação do Locus ceruleus



Fonte: Autores (2021).

Legenda: Imagem microscópica do tronco cerebral de rato, com identificação da área de estudo e suas estruturas adjacentes. Locus ceruleus (LC); Quarto Ventrículo (4V); Núcleo Trigeminal do Mesencéfalo (NTM); Pedúnculo Cerebelar Superior (PCS); Camada Molecular do Cerebelo (CM-Cb). Aumento de 10x. Coloração Violeta Cresil.

Figura 3 – Fotomicrografia para identificação do Hipotálamo do cérebro de rato



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Imagem microscópica do Hipotálamo do cérebro de rato. Contornos em amarelo: Núcleo Hipotalâmico Ventromedial (VM) e Núcleo Hipotalâmico Dorsomedial (DM). Trato Mamilotalâmico (mt); Fórnix (f); Terceiro Ventrículo (3V) e Núcleo Arqueado do Hipotálamo (ArcD). Aumento de 2,5x. Coloração Violeta Cresil.

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DA MORTE CELULAR ATRAVÉS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA (ENSAIO DE TUNEL)

O ensaio de TUNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*) foi utilizado para identificar células cujo DNA estaria fragmentado, ou seja, células apoptóticas no tecido nervoso. Nesse sentido, secções do cérebro e do tronco encefálico embebidos em parafina foram desparafinizados em xilol e hidratados por gradiente decrescente de etanol, 0,85% de NaCl e PBS. Para fixação das lâminas estas foram mergulhadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos a 37°C e lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos cada. Para permeabilização das membranas celulares, as mesmas foram imersas por uma solução de proteinase K 0,1% em PBS durante 15 minutos. Posteriormente, os tecidos foram lavados em PBS duas vezes (5 minutos por vez) e para finalizar as lâminas foram lavadas em água destilada. Os demais procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do kit *Click-iT™ Plus TUNEL Assay for In Situ Apoptosis Detection (Thermo Fisher Scientific)* (GUO *et al.*, 2019; STECCO *et al.*, 2005; YAMAGUCHI; SHEN, 2013).

4.7 COLORAÇÃO VON KOSSA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR POR MINERALIZAÇÃO CELULAR E TECIDUAL

Como não houve um número expressivo de células apoptóticas marcadas pela técnica de Tunel, outras amostras foram coradas pela técnica de Von Kossa (SHEEHAN; HRAPCHAK, 1980). Esta técnica evidencia cálcio tanto no tecido como no interior das células, destacados como grânulos pretos que pela técnica foram impregnados por prata, detectando assim a mineralização das células e consequente necrose celular (CHAKRABARTY *et al.*, 2011; GOODNOUGH *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016).

As secções do cérebro e do tronco encefálico embebidos em parafina foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em água destilada por 5 minutos. As amostras foram imersas em solução de nitrato de prata a 5% e colocadas sob a luz ultravioleta por 20 minutos. Logo em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada e o excesso de nitrato de prata removido com tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e passadas por um contra coloração por Safranina durante 5 minutos e novamente lavadas em água destilada. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcool graduado e diafanizadas em xilol e finalmente montadas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (*One-Way ANOVA*), seguida do teste de comparações de médias de Tukey. Utilizamos o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e foi adotado o nível de significância de 5% para todas as análises.

5 RESULTADOS

Para validar o modelo experimental, foi realizada a dosagem de testosterona total no sangue dos animais, no qual foi possível observar que a testosterona total sérica nos animais tratados com ambos esteroides foi maior que o grupo controle, o que valida as dosagens e a forma de aplicação escolhidas para o atual trabalho.

Foi observado que todos os animais tratados com esteroides anabolizantes e que praticaram exercício físico (DPE e DCE), apresentaram uma dosagem de testosterona sérica maior que o grupo controle (CE), validando as dosagens e a forma de aplicação escolhida. Nos grupos em que foi administrado o DC, observou-se um aumento crescente da dosagem de testosterona conforme as dosagens aplicadas de esteroides, notando-se que o grupo de 15mg/kg apresentou a maior média sérica de testosterona, seguidos dos grupos de 10mg/kg e 5mg/kg, respectivamente. Nos grupos tratados com DP, os resultados obtidos foram diferentes, visto que os grupos tratados com 10 e 15mg/kg, foram iguais entre si, e com níveis de hormônio maior que o grupo tratado com 5mg/kg. Nos grupos dos animais sedentários, foi possível observar que todos os animais tratados com esteroides (DPS e DCS) apresentaram dosagens séricas de testosterona maiores que o grupo controle sedentário (CS), observando os dois esteroides em experimento, foi possível identificar semelhanças em seus resultados, apresentando os mesmos padrões, no qual os grupos tratados com 15mg/kg apresentaram resultados superiores aos grupos tratados com 10mg/kg, sendo este último, com média maior que os grupos tratados com 5mg/kg, validando o método (DAMIÃO, 2020).

5.1 ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL NO LOCUS CERULEUS

Nos animais dos diferentes grupos sedentários, foi possível observar diferenças significativas na densidade neuronal nos grupos tratados com Cipionato de Testosterona (DPS) nas doses: 5mg ($25,00 \pm 4,47$); 10mg ($23,67 \pm 4,45$) e 15mg ($21,93 \pm 5,65$); assim como para Decanoato de Nandrolona (DCS) nas doses: 5mg ($23,40 \pm 3,81$); 10mg ($22,80 \pm 3,80$) e 15mg ($22,80 \pm 4,54$), quando comparados ao grupo controle (CS) que foi de $34,27 \pm 6,06$. A redução neuronal chegou a 36% para o grupo DPS 15 mg, quando confrontado ao grupo controle (CS) (TABELA 2).

Tabela 2 – Quantificação dos corpos de neurônios no Locus ceruleus. Grupos experimentais sedentários/doses, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	34,27 \pm 6,06
DPS 5mg	25,00 \pm 4,47	27,0 %	0,0073*
DCS 5mg	23,40 \pm 3,81	31,7 %	0,0016*
DPS 10mg	23,67 \pm 4,45	31,0 %	0,0027*
DCS 10mg	22,80 \pm 3,80	33,45 %	0,0008*
DPS 15mg	21,93 \pm 5,65	36,0 %	0,0022*
DCS 15mg	22,80 \pm 4,54	33,4 %	0,0081*

Fonte: Autores.

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Os resultados também mostraram valores estatisticamente diferentes na densidade neuronal nos grupos que fizeram exercício físico associado ao tratamento com DP e DC em relação ao grupo controle (CE= 31,00 \pm 6,98). Para os grupos DPE, os valores em média de corpos celulares de neurônios, nas diferentes doses foram: DPE 5mg 20,87 \pm 3,23; DPE 10mg 21,93 \pm 4,91 e DPE 15 mg 21,47 \pm 4,36 enquanto que, os grupos Decanoato de Nandrolona (DCE), nas diferentes doses foram: DCE 5mg 21,53 \pm 4,34; DCE 10 mg 23,53 \pm 1,68 e DCE 15mg 23,40 \pm 2,20. A redução neuronal chegou a 39% no grupo DPE 5mg, comparando-o ao controle (CE) (TABELA 3).

Tabela 3 – Quantificação dos corpos de neurônios no Locus ceruleus. Grupos experimentais que praticaram exercício físico, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

(continua)

Grupos	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CE	31,00 \pm 6,98

Tabela 3 – Quantificação dos corpos de neurônios no Locus ceruleus. Grupos experimentais que praticaram exercício físico, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

(continuação)

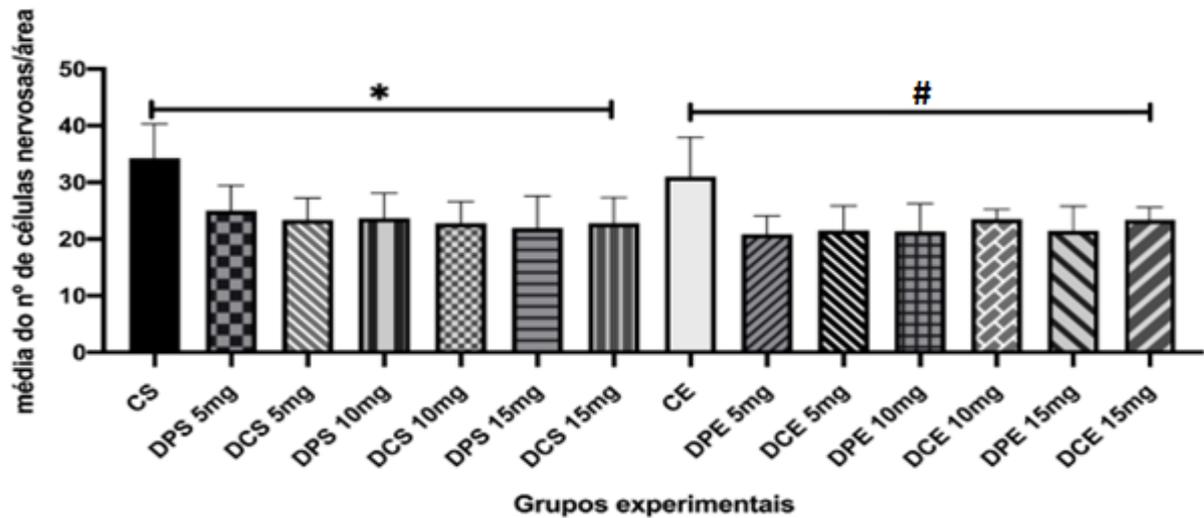
Grupos	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
DPE 5mg	20,87 \pm 3,23	39,0 %	0,0162*
DCE 5mg	21,53 \pm 4,34	37,1 %	0,0021*
DPE 10mg	21,93 \pm 4,91	37,7 %	0,0163*
DCE 10mg	23,53 \pm 1,68	31,3 %	0,0245*
DPE 15mg	21,47 \pm 4,36	37,3 %	0,0027*
DCE 15mg	23,40 \pm 2,20	31,7 %	0,0483*

Fonte: Autores (2021).

Legenda: Onde CE = Controle Exercício, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício, DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CE, mas não diferem entre si.

Vale ressaltar que, independentemente das concentrações das doses administradas para ambos os fármacos utilizados no experimento, a densidade neuronal no locus ceruleus não se mostrou estatisticamente diferente (GRÁFICO 1). Sendo provável que as concentrações das doses dos anabolizantes, que já estão bem acima da dose terapêutica, podem se assemelhar nos processos e mecanismos fisiológicos, que prejudicam o sistema nervoso central, reduzindo a densidade de neurônios. Com isso, observa-se que a partir da menor dose suprafisiológica (5mg/kg), utilizada nos tratamentos dos animais neste experimento, os efeitos associados aos anabolizantes são de extrema preocupação aos seus usuários, salientando-se, que conforme a literatura, as doses podem variar de 10 a 100 vezes a dose terapêutica.

Gráfico 1 – Média do número de corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Locus ceruleus, dos grupos dos animais sedentários e exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas.

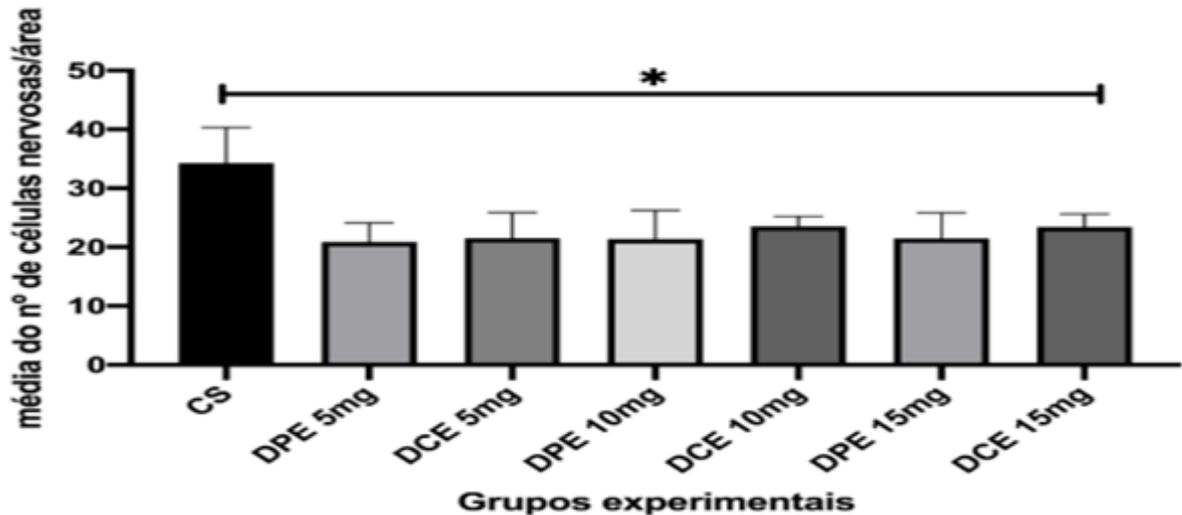


Fonte: Autores (2021).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CE, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, CE = Controle Exercício, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Por outro lado, os dados obtidos possibilitaram realizar uma análise comparativa entre os animais do grupo controle sedentário (CS) e os animais tratados com esteroides anabolizantes (DP e DC) concomitantemente ao exercício físico, no qual pode observar que houve uma diferença estatisticamente significativa, sendo que, a média de corpos celulares de neurônios no locus ceruleus foi menor nos grupos tratados com esteroides anabolizantes e submetidos ao exercício físico que os animais do grupo controle sedentário (CS) (GRÁFICO 2). Os valores referentes às médias foram: CS 34,27 ± 6,06; DPE 5mg 20,87 ± 3,23; DCE 5 mg 21,53 ± 4,34; DPE 10mg 21,93 ± 4,91; DCE 10mg 23,53 ± 1,68; DPE 15mg 21,47 ± 4,36 e DCE 15 mg 23,40 ± 2,20 chegando a ter uma redução neuronal de até 39,1% no grupo DPE 5mg comparando-o ao controle sedentário (TABELA 4).

Gráfico 2 – Média do número de corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Locus ceruleus, comparando o grupo dos animais exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas ao grupo CS.



Fonte: Autores (2021).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA no Locus ceruleus. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

Grupos	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	34,27 \pm 6,06
DPE 5mg	20,87 \pm 3,23	39,1 %	< 0,0001*
DCE 5mg	21,53 \pm 4,34	37,2 %	< 0,0001*
DPE 10mg	21,93 \pm 4,91	36,0 %	< 0,0001*
DCE 10mg	23,53 \pm 1,68	31,3 %	< 0,0001*
DPE 15mg	21,47 \pm 4,36	37,3 %	< 0,0001*
DCE 15mg	23,40 \pm 2,20	31,7 %	< 0,0001*

Fonte: Autores (2021).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e Decanoato de Nandrolona Exercício (DCE). * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

5.1.1 Identificação da Morte Celular através de Fragmentação do DNA (Apoptose), no Locus ceruleus

Para analisar a variabilidade das células apoptóticas no locus ceruleus, seguiu-se o protocolo imunohistoquímico de marcação do Ensaio de Tunel, no qual as células apoptóticas destacariam no campo visual através da fragmentação celular, sendo as células apoptóticas facilmente identificadas. Portanto, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa de células em apoptose nos animais sedentários tratados com esteroides (DPS e DCS), independentemente de suas concentrações, quando relacionados com os animais do grupo CS. Estes resultados apontam que, provavelmente, as células do locus ceruleus não estavam sofrendo o processo de apoptose celular, mas, possivelmente, estavam apresentando outro processo ou mecanismo de morte celular.

Portanto, como não houve diferença estatística significativa de células em apoptose tanto nos animais sedentários tratados com esteroides (DPS e DCS), como nos animais do grupo CS. Estas não foram quantificadas conforme técnica de contagem aleatória simples já mencionada anteriormente.

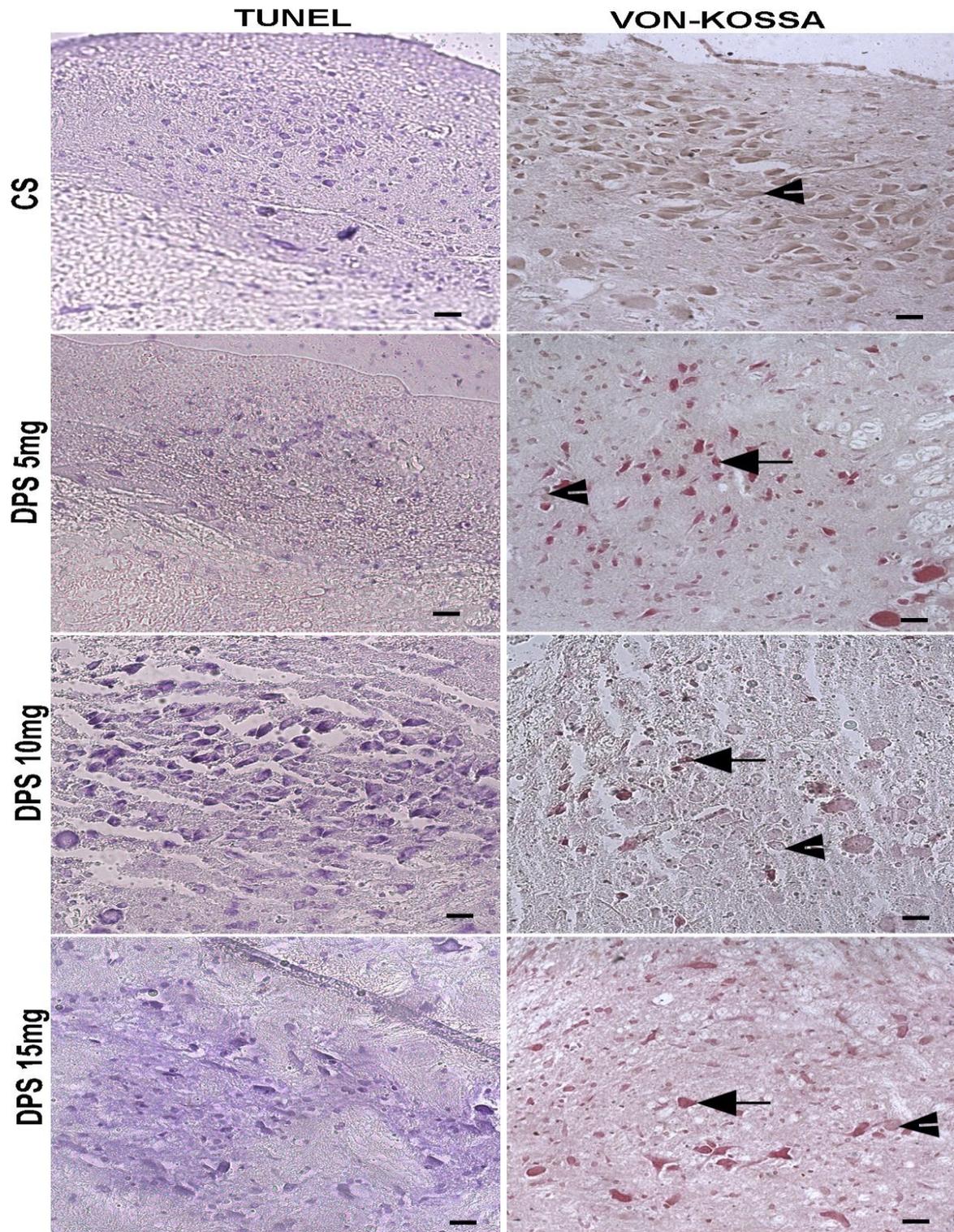
Para os animais tratados com esteroides e que praticaram exercício físico, os resultados foram similares aos obtidos para os animais sedentários, nos quais, não foram possíveis identificar diferenças estatisticamente significativas de células apoptóticas no locus ceruleus. Isto sugere que as células desta região estariam sofrendo o processo de morte celular diferentemente de apoptose típica e, possivelmente, sendo submetidas a reações neurotóxicas, provenientes por diversos mecanismos degenerativos, motivados pelos esteroides anabolizantes.

5.1.2 Identificação de morte celular por mineralização celular e tecidual – Coloração pela metodologia de Von Kossa, no Locus ceruleus

Como os resultados do Ensaio de Tunel demonstraram que a diminuição na densidade neuronal não estava sendo desencadeada por processo de apoptose típica, fez-se necessário a utilização de outro método de coloração para identificar qual o processo que estaria levando a morte celular.

Diante disso, selecionou-se o teste de Von Kossa, um método de identificação de morte celular por mineralização celular tecidual. Esta técnica tem por função evidenciar o cálcio (Ca^{2+}) tanto no tecido como no interior das células, o qual se destaca como grânulos pretos impregnados por prata. Assim, identifica-se as células que provavelmente estariam mineralizadas e, conseqüentemente, a provável causa de necrose celular. Ao observar os resultados após as análises pelo método proposto, foi possível identificar uma expressiva quantidade de células imunopositivadas para Ca^{2+} nos animais tratados com ambos os esteroides anabolizantes, tanto nos grupos dos animais sedentários (DPS e DCS), quanto nos grupos dos animais que praticaram exercício (DPE e DCE) (FIGURAS 4, 5, 6 e 7). Em contrapartida, não foram observadas células imunopositivadas para Ca^{2+} nos grupos controles sedentários e exercícios (CS e CE), evidenciando a toxicidade dos esteroides no locus ceruleus.

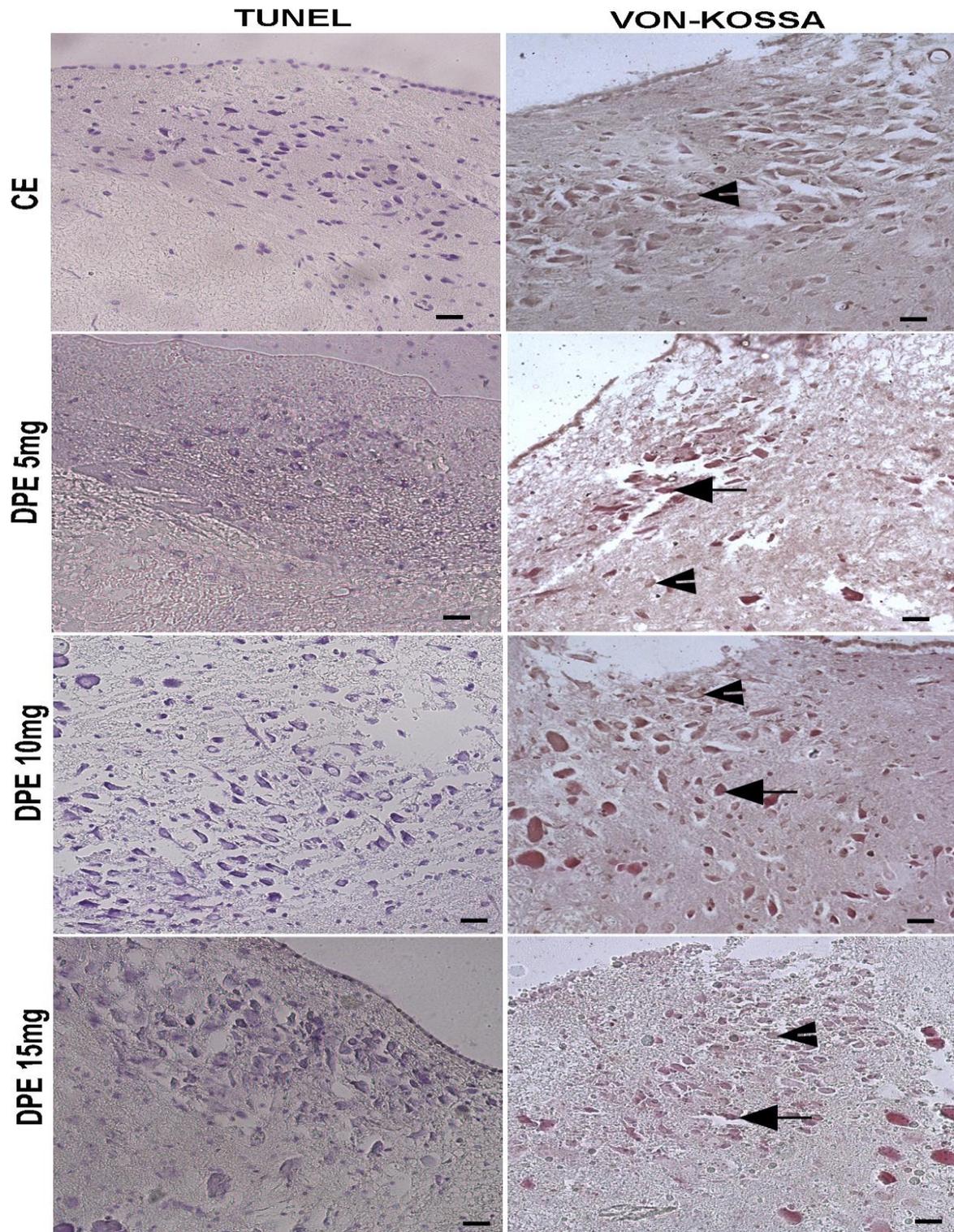
Figura 4 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e análise de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona, no Locus ceruleus.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Secções histológicas do locus ceruleus, grupos dos animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona (DP) em suas diferentes concentrações de doses. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: indicam neurônios morfologicamente normais. Onde: CS = Controle Sedentário e DPS= Cipionato de Testosterona Sedentário. Aumento de 20x.

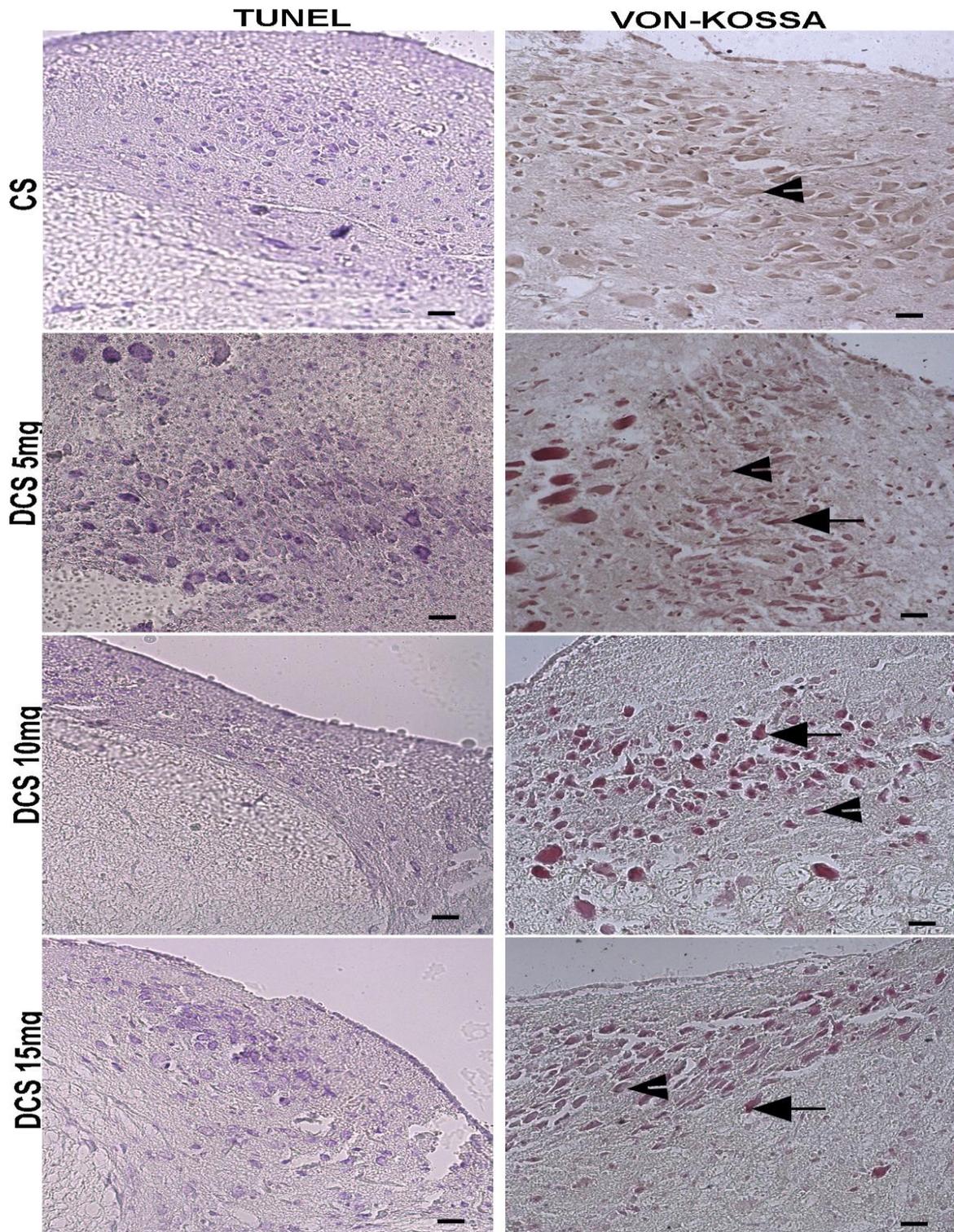
Figura 5 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e análise de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Cipionato de Testosterona, no Locus ceruleus.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Secções histológicas do locus ceruleus, grupos dos animais que praticaram exercício e foram tratados com Cipionato de Testosterona (DP) em suas diferentes concentrações de doses. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: indicam neurônios morfologicamente normais. Onde: CE = Controle Exercício e DPE = Cipionato de Testosterona Exercício. Aumento de 20x.

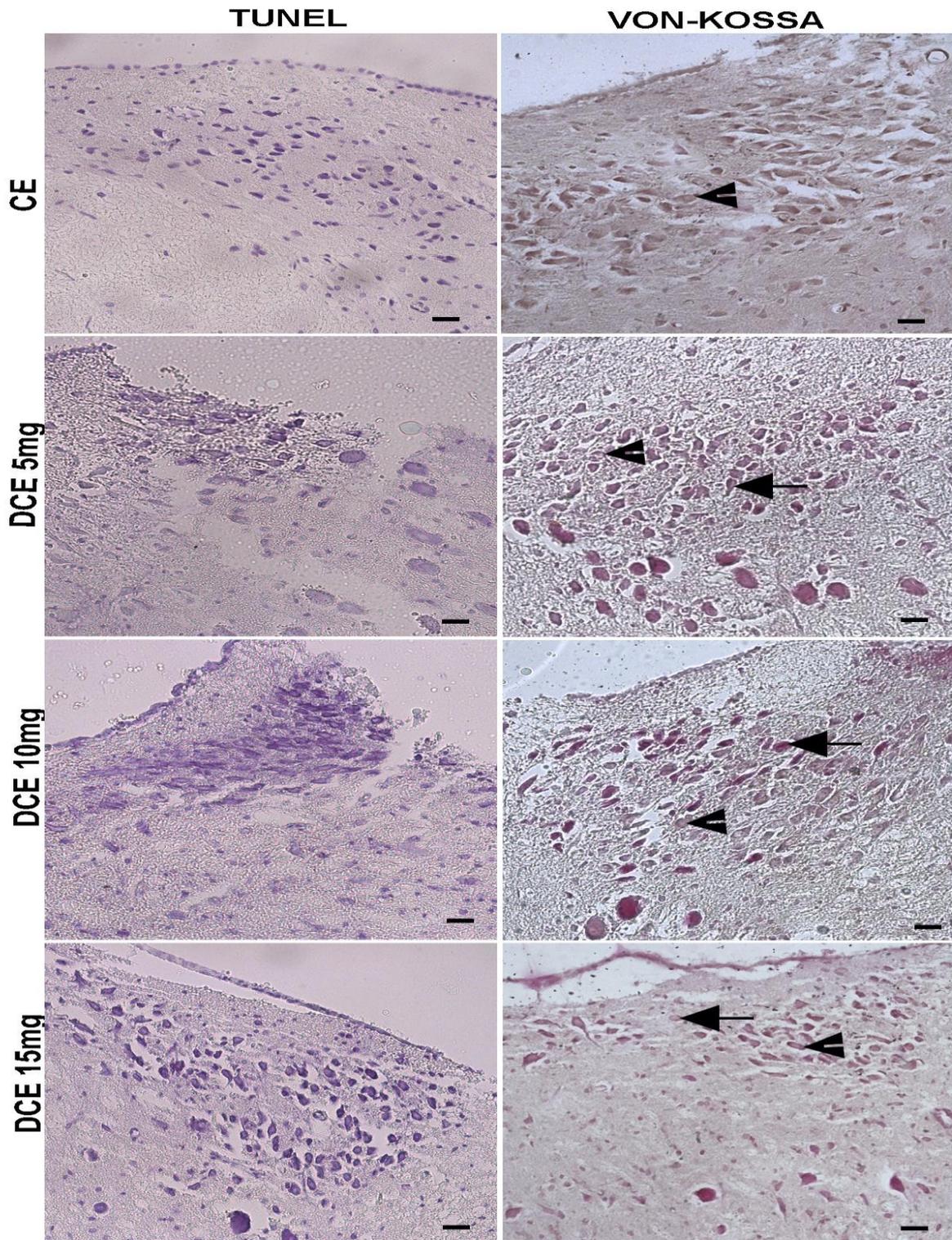
Figura 6 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona, no Locus ceruleus.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Cortes histológicos do locus ceruleus dos animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona (DC), nas diferentes doses de tratamento. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: neurônios morfologicamente normais. Onde: CS = Controle Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. Aumento de 20x.

Figura 7 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona, no Locus ceruleus.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Cortes histológicos do locus ceruleus dos animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona (DC), em suas distintas concentrações de doses. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: neurônios morfologicamente normais. Onde: CE = Controle Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Aumento de 20x.

5.2 ESTIMATIVA DA DENSIDADE NEURONAL DO HIPOTÁLAMO

Nos animais do grupo dos sedentários, observou-se diferenças significativas na perda neuronal, percebendo-se uma importante queda de neurônios no Hipotálamo. Nos animais submetidos ao tratamento com DP, obtiveram-se os seguintes resultados nas suas respectivas doses: 5mg ($18,55 \pm 7,36$); 10mg ($21,25 \pm 6,36$) e 15mg ($16,35 \pm 4,60$). Do mesmo modo, para os animais tratados com DC, os resultados apresentados foram: 5mg ($17,75 \pm 6,31$); 10mg ($19,60 \pm 6,84$) e 15mg ($17,80 \pm 6,00$). Ambos comparados ao grupo CS, com a média de: $29,35 \pm 5,72$. Com este resultado, observou-se que a redução de neurônios atingiu uma porcentagem de 44,29% no grupo DPS 15mg, comparando-o ao controle de seu mesmo grupo (CS) (TABELA 5).

Tabela 5 – Quantificação dos corpos de neurônios, grupos experimentais (sedentários/doses) no Hipotálamo. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	$29,35 \pm 5,72$
DPS 5mg	$18,55 \pm 7,36$	36,80 %	0,0001*
DCS 5mg	$17,75 \pm 6,31$	39,52 %	0,0001*
DPS 10mg	$21,25 \pm 6,36$	27,60 %	0,0081*
DCS 10mg	$19,60 \pm 6,84$	33,22 %	0,0003*
DPS 15mg	$16,35 \pm 4,60$	44,29 %	0,0001*
DCS 15mg	$17,80 \pm 6,00$	39,35 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Em relação aos animais que praticaram exercício físico associado ao tratamento, ambos esteroides, DP e DC, em suas distintas doses, quando comparados ao grupo controle ($CE= 34,06 \pm 17,57$), também foi possível observar diferença significativa na perda de neurônios no Hipotálamo. Nos grupos DPE, a média dos corpos de neurônios em suas respectivas doses

foram: DPE 5mg $13,88 \pm 5,82$; DPE 10mg $17,80 \pm 6,53$ e DPE 15mg $21,15 \pm 5,78$, enquanto que o grupo dos animais que foram tratados com Decanoato de Nandrolona (DCE), obtiveram os seguintes valores: DCE 5mg $19,55 \pm 4,83$; DCE 10mg $17,94 \pm 6,07$ e DCE 15mg $12,50 \pm 4,90$. A redução de neurônios no Hipotálamo atingiu 63,30%, quando comparado o grupo DCE 15mg ao grupo controle (CE) (TABELA 6).

Tabela 6 – Quantificação dos corpos de neurônios, no Hipotálamo. Grupos experimentais que praticaram exercício físico, média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

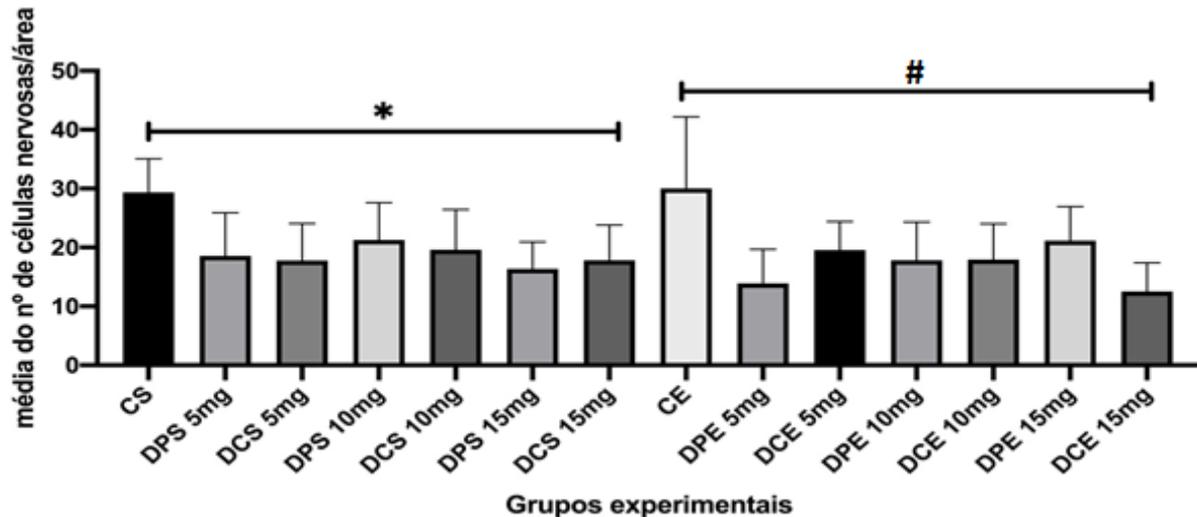
Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CE	$34,06 \pm 17,57$
DPE 5mg	$13,88 \pm 5,82$	59,25 %	0,0001*
DCE 5mg	$19,55 \pm 4,83$	42,60 %	0,0003*
DPE 10mg	$17,80 \pm 6,53$	47,74 %	0,0001*
DCE 10mg	$17,94 \pm 6,07$	47,33 %	0,0001*
DPE 15mg	$21,15 \pm 5,78$	37,90 %	0,0052*
DCE 15mg	$12,50 \pm 4,90$	63,30 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CE = Controle Exercício, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CE, mas não diferem entre si.

Similar ao locus ceruleus, no hipotálamo, os grupos experimentais: sedentário e exercício físico; independentemente das doses administradas para ambos os esteroides, a densidade de corpos de neurônios não se mostrou estatisticamente diferente (GRÁFICO 3). Desta maneira, é provável que todas as concentrações utilizadas no estudo, que estão acima da dose terapêutica, desenvolvem sequelas/danos neurológicos semelhantes, em relação a densidade neuronal hipotalâmica, desencadeando relevante perda de neurônios.

Gráfico 3 – Média dos corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Hipotálamo, dos grupos dos animais sedentários e exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes em 3 concentrações de doses distintas.

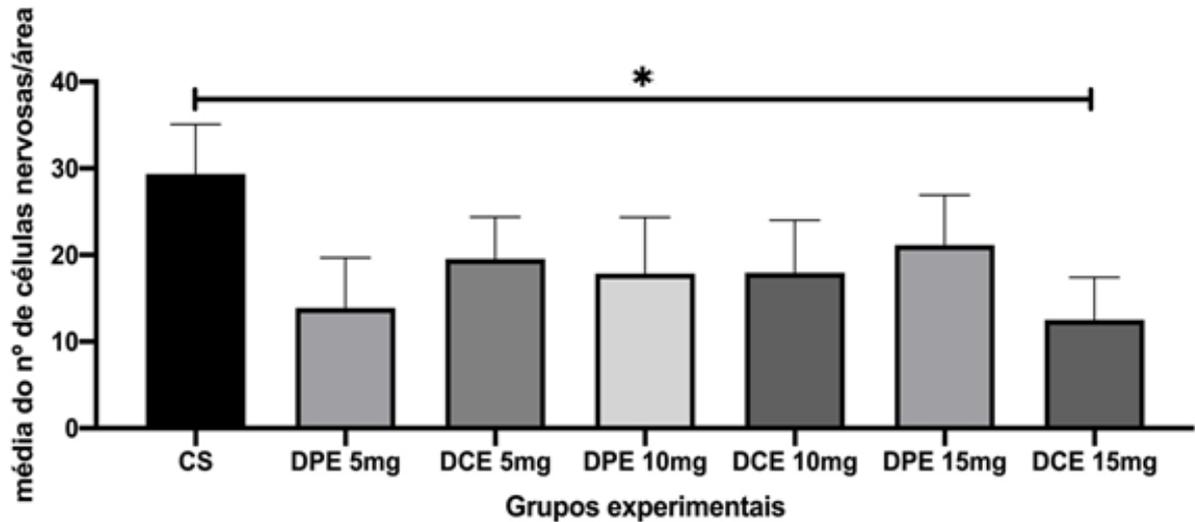


Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa do grupo ao grupo CS, mas não diferem entre si. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CE, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, CE = Controle Exercício, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Ao analisar e comparar os resultados da média dos corpos celulares de neurônios dos animais do grupo controle sedentário (CS), aos grupos tratados com esteroides anabolizantes, que praticaram exercício físico (DPE e DCE), foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas, no qual, a média de corpos de neurônios no hipotálamo foi quantitativamente menor nos grupos tratados com esteroides anabolizantes simultaneamente ao exercício físico, em relação aos animais do grupo CS (GRÁFICO 4). Semelhantemente aos resultados observados no locus ceruleus, quando comparado os mesmos grupos. Mediante o exposto, as médias analisadas destes grupos foram as seguintes: CS $29,35 \pm 5,72$; DPE 5mg $13,88 \pm 5,82$; DCE 5mg $19,55 \pm 4,83$; DPE 10mg $17,80 \pm 6,53$; DCE 10mg $17,94 \pm 6,07$; DPE 15mg $21,15 \pm 5,78$ e DCE 15mg $12,50 \pm 4,90$. O maior percentual de perda neuronal foi de 57,41%, quando comparado o grupo tratado, DCE 15mg, ao grupo CS (TABELA7).

Gráfico 4 – Média de células neuronais (número de células nervosas/área), obtido através da quantificação de neurônios em cortes histológicos do Hipotálamo, comparando o grupo dos animais exercitados expostos por dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses ao grupo CS.



Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no Hipotálamo. Média \pm desvio padrão da densidade neuronal, redução neuronal em porcentagem (%) bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	29,35 \pm 5,72
DPE 5mg	13,88 \pm 5,82	52,71 %	0,0001*
DCE 5mg	19,55 \pm 4,83	33,39 %	0,0001*
DPE 10mg	17,80 \pm 6,53	39,35 %	0,0001*
DCE 10mg	17,94 \pm 6,07	38,88 %	0,0001*
DPE 15mg	21,15 \pm 5,78	27,94 %	0,0001*
DCE 15mg	12,50 \pm 4,90	57,41 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

5.2.1 Identificação da Morte Celular através de Fragmentação do DNA (Apoptose), no Hipotálamo

Para analisar a variabilidade das células apoptóticas no hipotálamo, seguiu-se o mesmo protocolo imunohistoquímico de marcação do Ensaio de Tunel, que foram realizados para o locus ceruleus. Desta maneira, esperava-se que as células apoptóticas destacariam no campo visual através da fragmentação celular, assim, apresentando esta característica, a visualização ficaria evidente para sua identificação. Entretanto, não foi observado significativo número de células apoptóticas no hipotálamo, semelhantemente, aos resultados analisados no locus ceruleus, em investigação aos grupos dos animais sedentários tratados com esteroides anabolizantes, DP e DC, independentemente das concentrações de esteroides em que os animais foram expostos no estudo, equiparando aos animais do grupo CS, que não utilizaram nenhum tipo de esteroide, sugerindo que no hipotálamo, o processo de morte celular, possivelmente seria o mesmo que estava ocorrendo no locus ceruleus.

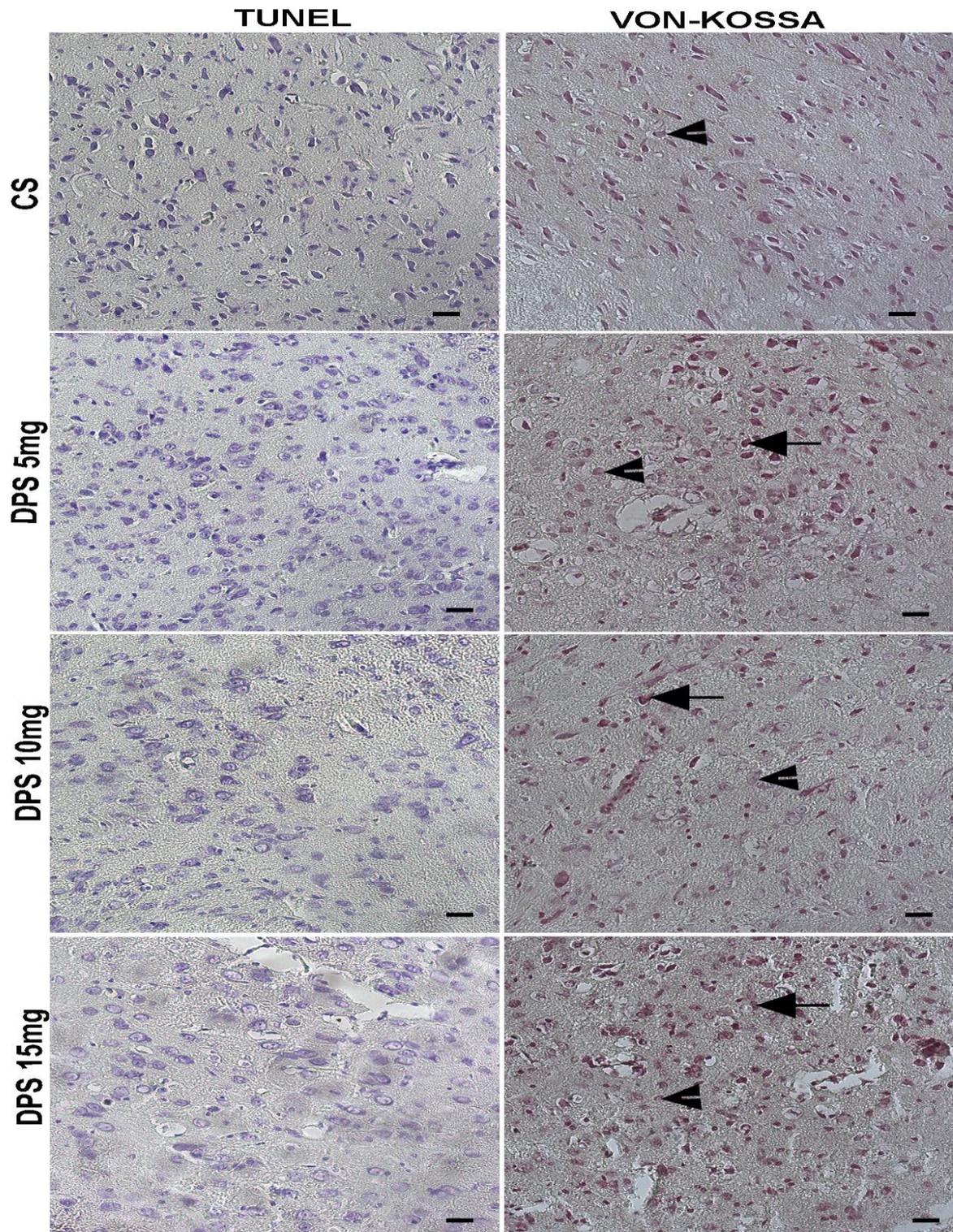
Similarmente ao locus ceruleus, entre os animais CE e os animais que praticaram exercício físico, tratados com anabolizantes (DPE e DCE), foram observados resultados idênticos, não sendo caracterizadas células apoptóticas no Teste Tunel no hipotálamo, desta maneira, as hipóteses sugeridas diante do resultado encontrado, seria que os neurônios hipotalâmicos possivelmente estavam submetidos as mesmas reações neurotóxicas expressas pelas células do locus ceruleus, provenientes dos efeitos exacerbados dos esteroides anabolizantes, afetando importantes mecanismos fisiológicos e biológicos no SNC dos animais, desencadeando expressivos efeitos degenerativos.

5.2.2 Identificação de morte celular por mineralização celular e tecidual – Coloração pela metodologia de Von Kossa, no Hipotálamo

Do mesmo modo, ao observar que os resultados do Ensaio de Tunel não apontavam que a redução de neurônios estava sendo desencadeada por processo de apoptose típica, conseqüentemente, foi realizado protocolo análogo ao atribuído ao locus ceruleus, para a possível identificação da morte celular dos neurônios hipotalâmicos.

Exposto isso, prosseguiu para a coloração de Von Kossa, para identificação provável de mineralização celular tecidual, igualmente aos neurônios do locus ceruleus, para a caracterização de cálcio (Ca^{2+}) tanto no tecido como no interior das células, com destaques de grânulos pretos impregnados pela prata e, conseqüentemente, constatar a provável causa da morte dos neurônios no hipotálamo. Após realizar os procedimentos pelo método supracitado, foi possível identificar uma expressiva quantidade de células imunopositivadas para Ca^{2+} nos animais tratados com ambos os esteroides anabolizantes, tanto nos grupos dos animais sedentários (DPS e DCS), quanto nos grupos dos animais que praticaram exercício (DPE e DCE) (FIGURAS 8, 9, 10 e 11), sugerindo que a exposição excessiva aos anabolizantes poderiam desencadear supostamente a morte celular por necrose, no hipotálamo. Entretanto, células imunopositivadas para Ca^{2+} não foram observadas nos grupos controles sedentários e exercícios (CS e CE), inferindo que a toxicidade dos anabolizantes podem afetar os neurônios hipotalâmicos da mesma maneira que afetaram os neurônios do locus ceruleus.

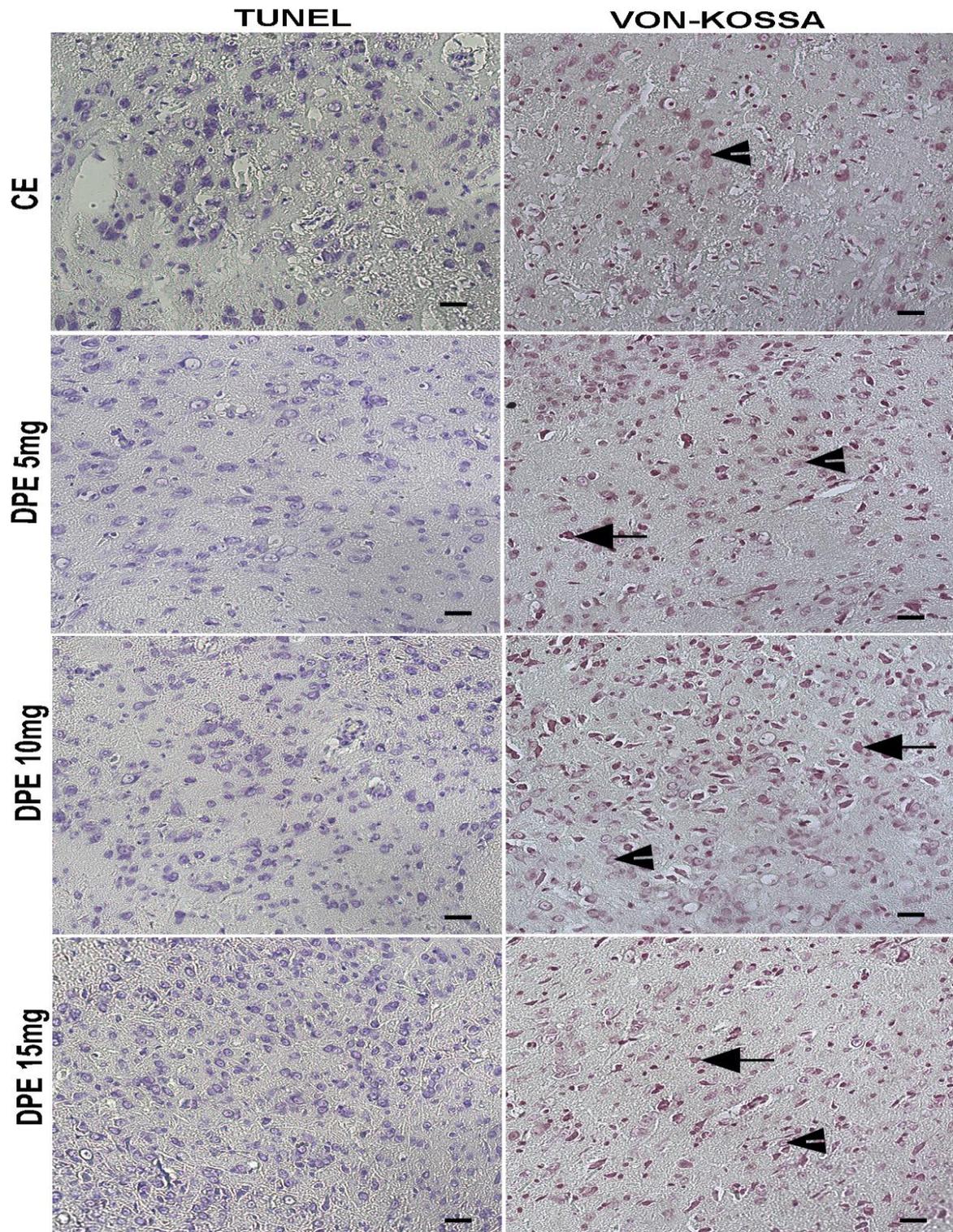
Figura 8 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona, no Hipotálamo.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Secções histológicas do hipotálamo, grupos dos animais sedentários tratados com Cipionato de Testosterona (DP) em suas distintas doses de concentrações. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: indicam neurônios morfologicamente normais. Onde: CS = Controle Sedentário e DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário. Aumento de 20x.

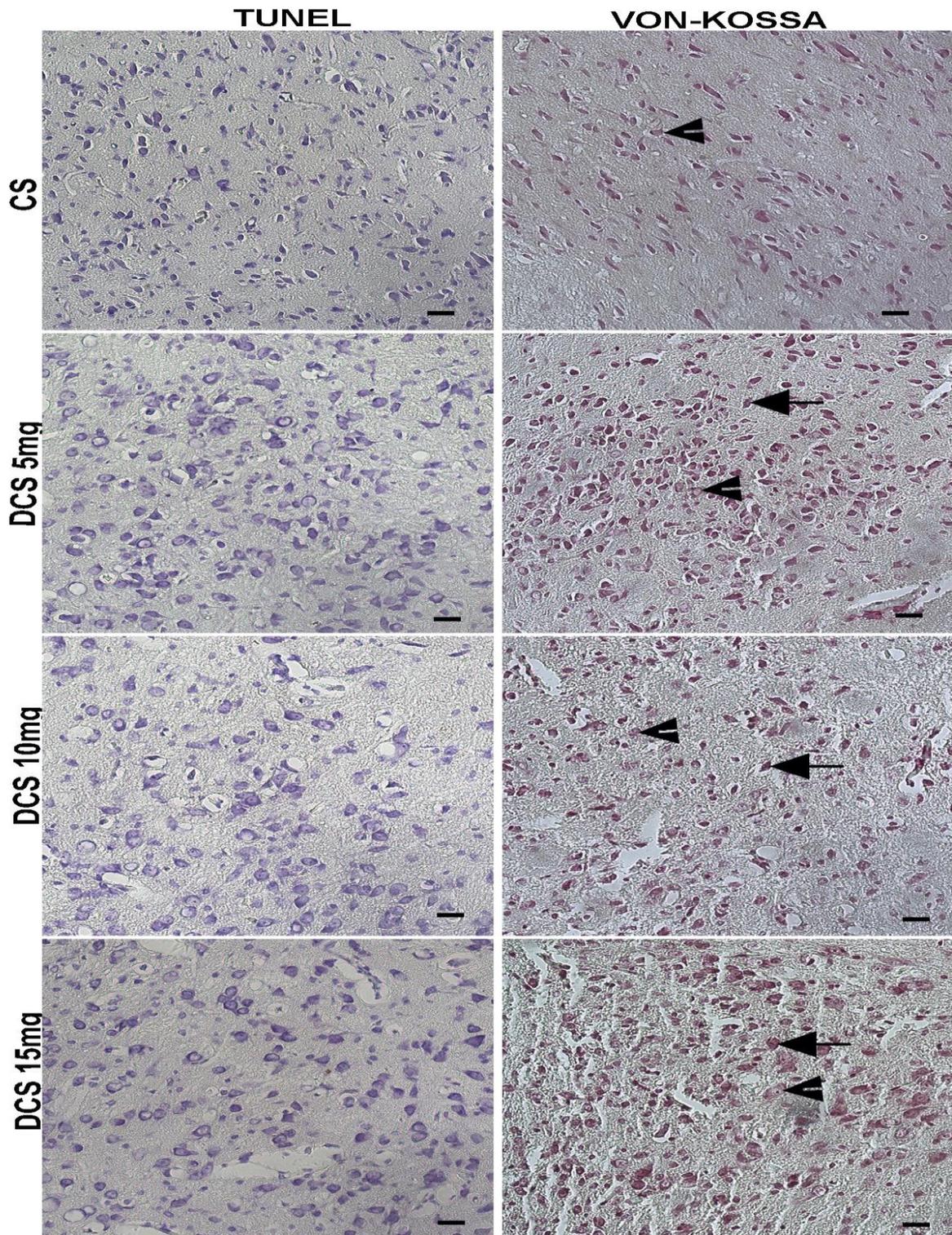
Figura 9 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Cipionato de Testosterona, no Hipotálamo.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Secções histológicas do hipotálamo, grupos dos animais exercitados e tratados com Cipionato de Testosterona (DP) em suas diferentes concentrações de doses. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: indicam neurônios morfologicamente normais. Onde: CE = Controle Exercício e DPE = Cipionato de Testosterona Exercício. Aumento de 20x.

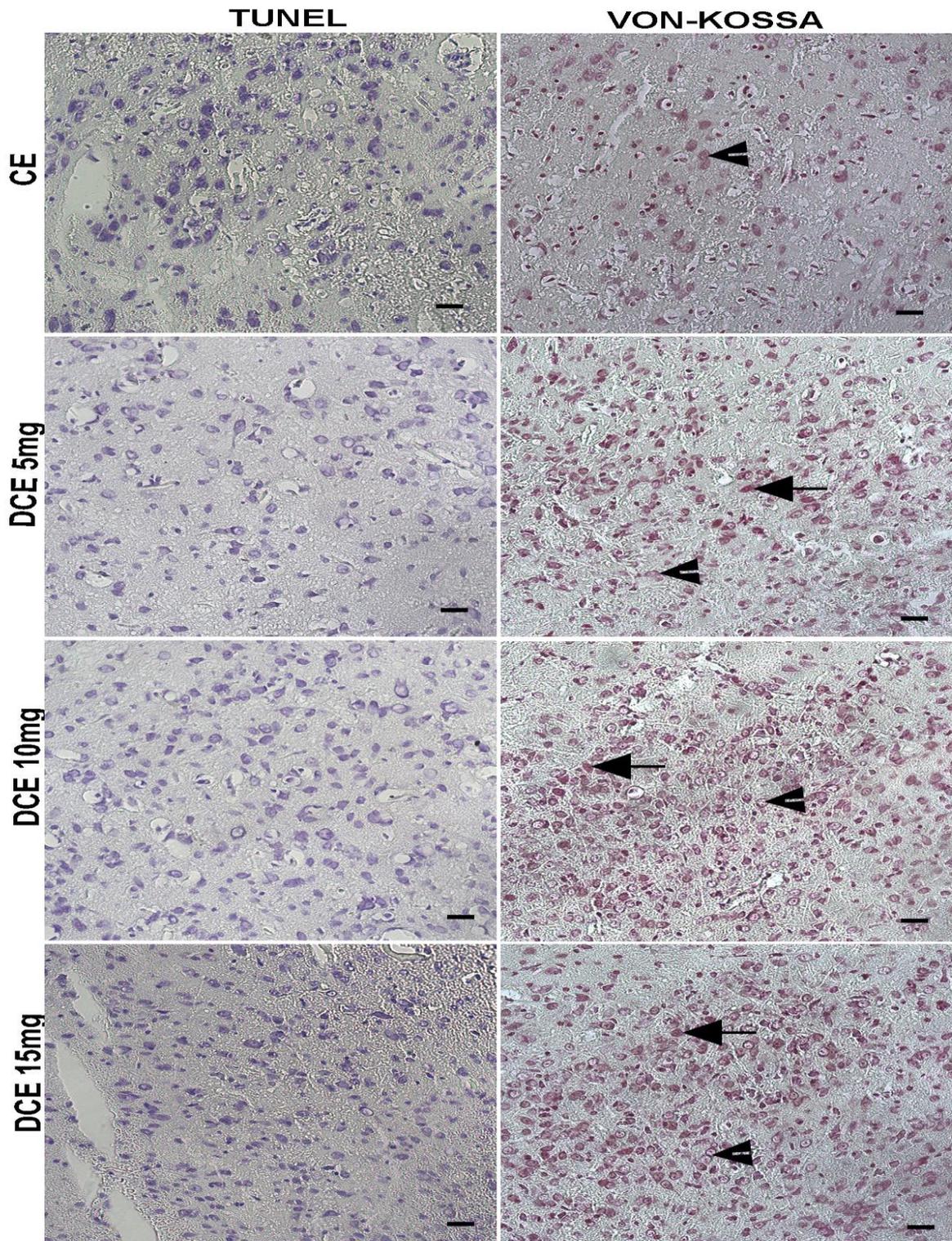
Figura 10 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona, no Hipotálamo.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Cortes histológicos do hipotálamo dos animais sedentários tratados com Decanoato de Nandrolona (DC), nas diferentes doses de tratamento. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: neurônios morfológicamente normais. Onde: CS = Controle Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. Aumento de 20x.

Figura 11 – Análise imunohistoquímica para apoptose celular (TUNEL) e coloração de VON KOSSA para identificação de neurônios disformes positivos para Ca^{2+} , de grupos de animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona, no Hipotálamo.



Fonte: Autores (2022).

Legenda: Secções histológicas do hipotálamo, animais exercitados tratados com Decanoato de Nandrolona (DC), em suas distintas concentrações de doses. Setas: neurônios positivos para Ca^{2+} . Pontas de setas: neurônios morfologicamente normais. Onde: CE = Controle Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Aumento de 20x.

5.3 ESTIMATIVA DO VOLUME DO CÓRTEX CEREBRAL: RETROSPLENIAL, MOTOR E SOMATOSSENSORIAL

Na análise realizada no córtex cerebral, a área cortical retrosplenial dos animais tratados com esteroides anabolizantes, os grupos dos animais sedentários (DPS DCS), não obtiveram diferenças estatisticamente significativas, equiparando ao grupo CS, na densidade cortical retrosplenial. As mensurações apresentaram em média os seguintes resultados (expressos em micrômetros): DPS 5mg $772,39 \pm 161,78$; DCS 5mg $799,98 \pm 132,06$; DPS 10mg $806,12 \pm 158,66$; DCS 10mg $838,83 \pm 135,61$; DPS 15mg $813,75 \pm 153,04$ e DCS 15mg $821,80 \pm 160,55$, que foram comparados ao CS que apresentou espessura média de $897,93 \pm 219,66$ (TABELA 8).

Tabela 8 – Espessuras do córtex cerebral retrosplenial (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical retrosplenial, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	$897,93 \pm 219,66$
DPS 5mg	$772,39 \pm 161,78$	NS	0,0720
DCS 5mg	$799,98 \pm 132,06$	NS	0,4304
DPS 10mg	$806,12 \pm 158,66$	NS	0,5433
DCS 10mg	$838,83 \pm 135,61$	NS	0,9910
DPS 15mg	$813,75 \pm 153,04$	NS	0,5490
DCS 15mg	$821,80 \pm 160,55$	NS	0,8696

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. Sendo NS = não significativo.

Semelhante ao grupo dos animais sedentários, os animais que foram tratados e submetidos ao exercício físico (DPE e DCE), não expressaram valores estatisticamente significativos na perda do volume cortical retrosplenial, confrontado ao grupo CE. Os resultados, em média, das mensurações foram (expressos em micrômetros): DPE 5mg $795,44 \pm 122,70$; DCE 5mg $807,63 \pm 120,69$; DPE 10mg $742,03 \pm 129,22$; DCE 10mg $841,73 \pm 167,74$; DPE

15mg $881,34 \pm 170,53$ e DCE 15mg $847,97 \pm 182,78$, equiparando ao grupo CE que obteve uma densidade média de $760,17 \pm 149,21$ (TABELA 9).

Tabela 9 – Espessuras do córtex cerebral retrosplenial (μm). Grupos experimentais que praticaram exercício físico. Média \pm desvio padrão da densidade cortical retrosplenial, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

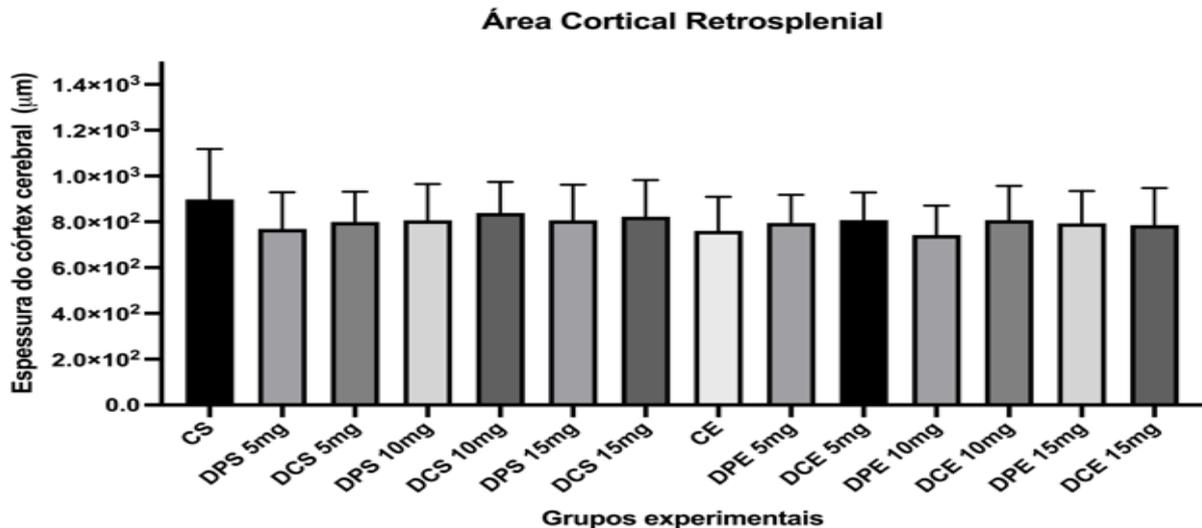
Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CE	$760,17 \pm 149,21$
DPE 5mg	$795,44 \pm 122,70$	NS	0,9999
DCE 5mg	$807,63 \pm 120,69$	NS	0,9975
DPE 10mg	$742,03 \pm 129,22$	NS	>0,9999
DCE 10mg	$841,73 \pm 167,74$	NS	0,9984
DPE 15mg	$881,34 \pm 170,53$	NS	>0,9999
DCE 15mg	$847,97 \pm 182,78$	NS	>0,9999

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CE = Controle Exercício, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Sendo NS = não significativo.

Observa-se na área cortical retrosplenial, ambos esteroides (DP e DC), não provocaram atenuação da densidade do córtex supracitado, independentemente das suas concentrações de doses, não expressando resultados significativos reduzidos estatisticamente, nos grupos dos animais sedentários (DPS e DCS) e também nos animais que praticaram exercício físico (DPE e DCE), equiparados aos seus respectivos controles (CS e CE) (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 – Média do volume do córtex cerebral retrosplenial (μm), grupos de animais sedentários e exercitados expostos a dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg).



Fonte: Autores (2022).

Nota: Onde CS = Controle Sedentário, CE = Controle Exercício, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Na área cortical motora, as mensurações demonstraram que houve expressiva redução no córtex dos animais sedentários tratados com esteroides anabolizantes (DPS e DCS), comparado ao grupo CS, com resultados estatisticamente significativos. As mensurações em média foram (expressos em micrômetros): DPS 5mg $838,73 \pm 84,28$; DCS 5mg $835,25 \pm 83,87$; DPS 10mg $937,32 \pm 134,67$; DCS 10mg $897,98 \pm 54,85$; DPS 15mg $865,49 \pm 111,08$ e DCS 15mg $918,91 \pm 102,42$, defrontando o grupo CS, que apresentou espessura média de $1150,36 \pm 152,62$. A área cortical motora atingiu uma redução máxima de 27,39% no grupo DCS 5mg (TABELA 10).

Tabela 10 – Espessuras do córtex cerebral motor (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	1150,36 \pm 152,62
DPS 5mg	838,73 \pm 84,28	27,09 %	0,0001*
DCS 5mg	835,25 \pm 83,87	27,39 %	0,0001*
DPS 10mg	937,32 \pm 134,67	18,52 %	0,0001*
DCS 10mg	897,98 \pm 54,85	21,94 %	0,0001*
DPS 15mg	865,49 \pm 111,08	24,76 %	0,0001*
DCS 15mg	918,91 \pm 102,42	20,12 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Contudo, nos grupos dos animais tratados com esteroides anabolizantes que simultaneamente exercitaram (DPE e DCE), não obteve-se redução estatisticamente significativa no córtex motor, equiparados ao grupo controle exercício (CE). Diante disso, as mensurações do córtex motor dos animais que praticaram exercício físico foram (expressos em micrômetros): DPE 5mg 849,57 \pm 43,49; DCE 5mg 842,90 \pm 53,35; DPE 10mg 828,91 \pm 95,59; DCE 10mg 958,97 \pm 85,75; DPE 15mg 1010,27 \pm 155,55 e DCE 15mg 945,29 \pm 107,78, que foram comparados ao CE que resultou a espessura média de 874,40 \pm 133,55 (TABELA 11).

Tabela 11 – Espessuras do córtex cerebral motor (μm). Grupos de animais exercitados. Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

(continua)

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CE	874,40 \pm 133,55
DPE 5mg	849,57 \pm 43,49	NS	0,9998
DCE 5mg	842,90 \pm 53,35	NS	0,9971

Tabela 11 – Espessuras do córtex cerebral motor (μm). Grupos de animais exercitados. Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

(continuação)

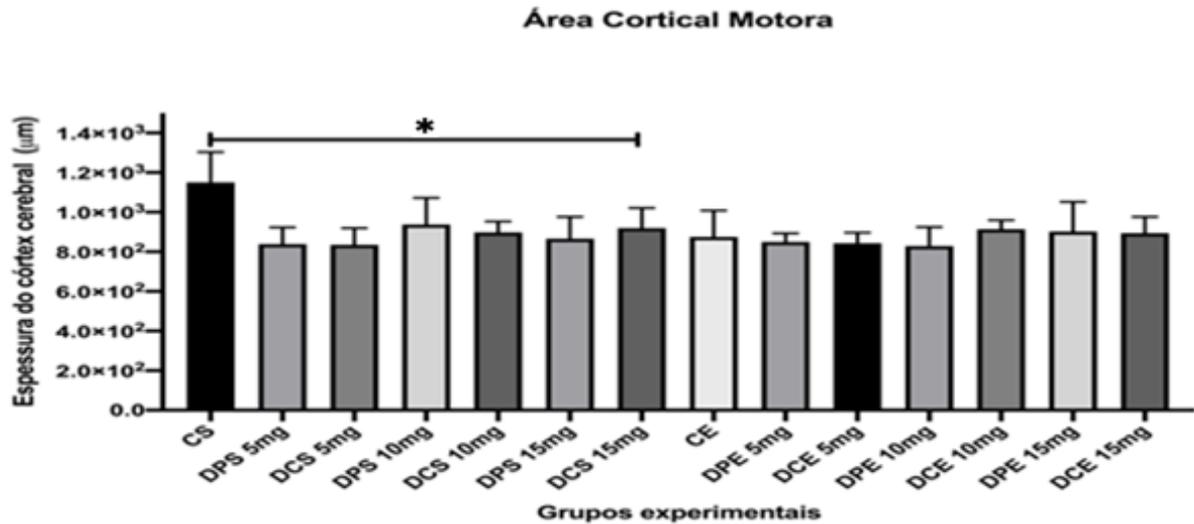
Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
DPE 10mg	828,91 \pm 95,59	NS	0,9438
DCE 10mg	958,97 \pm 85,75	NS	0,9922
DPE 15mg	1010,27 \pm 155,55	NS	0,9999
DCE 15mg	945,29 \pm 107,78	NS	>0,9999

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CE = Controle Exercício, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Sendo NS = não significativo.

Os resultados expressos na área cortical motora, demonstraram que houve diferença significativa na redução da densidade cortical motora nos grupos dos animais sedentários tratados com esteroides (DPS e DCS), observando a expressiva a perda de volume no córtex motor. Opostamente ao grupo sedentário, os animais que exercitaram durante o tratamento (DPE e DCE), apresentaram mensurações sem relevante redução estatística, ou seja, não obtiveram diferenças significativas, mantendo linearidade entre seus pares (GRÁFICO 6).

Gráfico 6 – Média do volume do córtex cerebral motor (μm), grupos dos animais sedentários e exercitados expostos a dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg).



Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, CE = Controle Exercício, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

No córtex sensitivo, foi possível observar dados semelhantes à área cortical motora, pelo qual, nota-se que os grupos dos animais tratados com esteroides anabolizantes, mas que não realizaram exercício físico (DPS e DCS) obtiveram resultados reduzidos no córtex em estudo, ou seja, na área cortical sensitiva, os grupos dos animais sedentários apresentaram resultados estatísticos significativamente reduzidos, equiparando os grupos tratados sedentários (DPS e DCS) ao controle de seu mesmo grupo (CS). Deste modo, os resultados expressos no córtex sensitivo pelos grupos supracitados foram (medidas expressas em micrômetros): DPS 5mg $920,35 \pm 110,79$; DCS 5mg $919,10 \pm 112,15$; DPS 10mg $1023,36 \pm 158,46$; DCS 10mg $991,39 \pm 94,52$; DPS 15mg $976,99 \pm 135,58$ e DCS 15mg $1019,23 \pm 118,53$, com análise realizada por método comparativo ao grupo CS que apresentou média de $1246,04 \pm 119,47$ nas mensurações corticais sensitivas. Além disso, foi possível identificar que os grupos DPS 5mg e DCS 5mg, obtiveram redução de até 26,14% e 26,24%, respectivamente (TABELA 12).

Tabela 12 – Espessuras do córtex cerebral sensitivo (μm). Grupos experimentais sedentários/doses. Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	1246,04 \pm 119,47
DPS 5mg	920,35 \pm 110,79	26,14 %	0,0001*
DCS 5mg	919,10 \pm 112,15	26,24 %	0,0001*
DPS 10mg	1023,36 \pm 158,46	17,87 %	0,0001*
DCS 10mg	991,39 \pm 94,52	20,44 %	0,0001*
DPS 15mg	976,99 \pm 135,58	21,59 %	0,0001*
DCS 15mg	1019,23 \pm 118,53	18,20 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário e DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Sob o mesmo ponto de vista, foi possível identificar que no córtex sensitivo, os dados apresentados pelos animais tratados que simultaneamente fizeram exercício físico (DPE e DCE), em sua maioria, estão em conformidade aos resultados expressos pelos animais sob as mesmas condições na área cortical motora, visto que, não foram identificados resultados de redução cortical expressivos, ou seja, não foram encontrados dados estatisticamente significativos na perda de volume cortical na área sensitiva. Porém, apenas o grupo DPE 10mg, obteve-se resultado significativo na queda de neurônios, sendo o único grupo a expressar resultado positivo na perda de densidade neuronal para os grupos dos animais exercitados, apresentando o resultado de $853,89 \pm 103,52 \mu\text{m}$. Os resultados expressos no córtex sensitivo pelos demais grupos e doses foram (medidas expressas em micrômetros): DPE 5mg ($978,90 \pm 104,31$); DCE 5mg ($919,43 \pm 82,66$); DCE 10mg ($1045,83 \pm 71,55$); DPE 15mg ($1100,81 \pm 199,53$) e DCE 15mg ($991,97 \pm 139,82$), uma vez que o grupo CE apresentou a média de $990,55 \pm 133,48$ (TABELA 13).

Tabela 13 – Espessuras do córtex cerebral sensitivo (μm). Grupos experimentais que praticaram exercício físico. Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução cortical em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

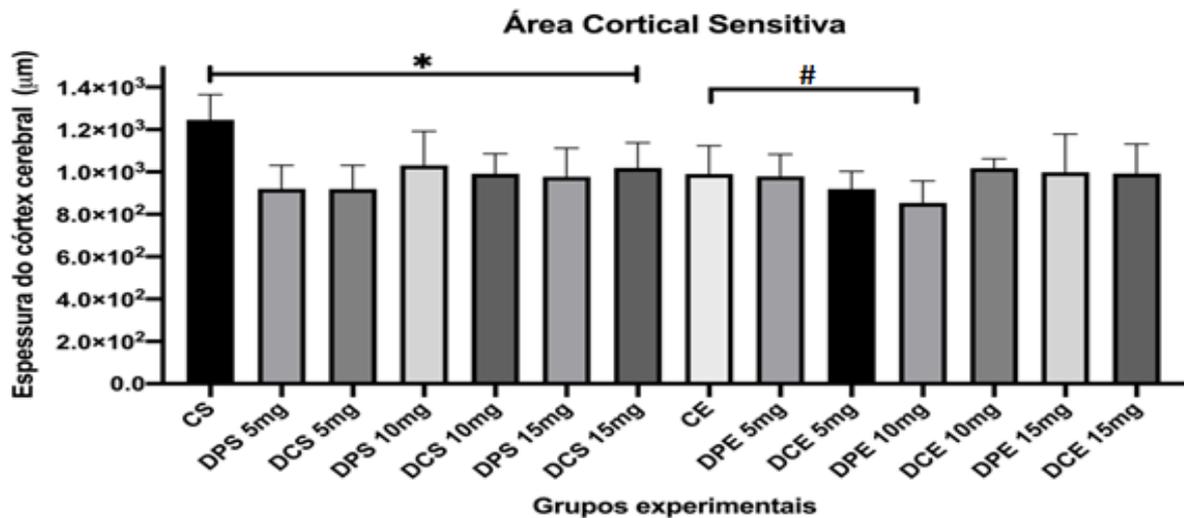
Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CE	990,55 \pm 133,48
DPE 5mg	978,90 \pm 104,31	NS	>0,9999
DCE 5mg	919,43 \pm 82,66	NS	0,5928
DPE 10mg	853,89 \pm 103,52	13,80 %	0,0044*
DCE 10mg	1045,83 \pm 71,55	NS	>0,9999
DPE 15mg	1100,81 \pm 199,53	NS	>0,9999
DCE 15mg	991,97 \pm 139,82	NS	>0,9999

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CE = Controle Exercício, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Sendo: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CE e NS = não significativo.

Por conseguinte, diante das análises dos dados apresentados no córtex sensitivo, foi possível identificar que dentre os grupos tratados com os dois esteroides em estudo, Cipionato de Testosterona (DP) e Decanoato de Nandrolona (DC), em suas três concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg), os animais dos grupos sedentários e apenas o grupo DPE 10mg, entre os grupos dos animais exercitados, apresentaram dados significativos na redução do córtex supracitado. Com isso, nota-se que a maioria dos animais que praticaram exercício físico, não ocorreu discrepância nas mensurações entre os grupos tratados (DPE e DCE) e o controle (CE) (GRÁFICO 7).

Gráfico 7 – Média do volume do córtex cerebral sensitivo (μm), grupos de animais sedentários e exercitados expostos a dois diferentes esteroides anabolizantes e três distintas concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg).



Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. # Diferença significativa quando comparado ao grupo CE. Onde: CS = Controle Sedentário, CE = Controle Exercício, DPS = Cipionato de Testosterona Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício, DCS = Decanoato de Nandrolona Sedentário e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Diante dos dados expostos, ainda foi possível observar a discrepância da densidade cortical motora, quando confrontados o grupo controle sedentário (CS) e os grupos tratados com esteroides que simultaneamente praticaram exercício físico (DPE e DCE), apresentando redução estatisticamente significativa, independentemente das doses administradas em todos os grupos (GRÁFICO 8). Os resultados da densidade cortical dos grupos supracitados foram (expressas em micrômetros): DPE 5mg $849,57 \pm 43,49$; DCE 5mg $842,90 \pm 53,35$; DPE 10mg $828,91 \pm 95,59$; DCE 10mg $958,97 \pm 85,75$; DPE 15mg $1010,27 \pm 155,55$ e DCE 15mg $945,29 \pm 107,78$, confrontados ao grupo CS que obteve a média de $1150,36 \pm 152,62$; deste modo, o córtex motor obteve redução de até 27,94% no grupo DPE 10mg (TABELA 14).

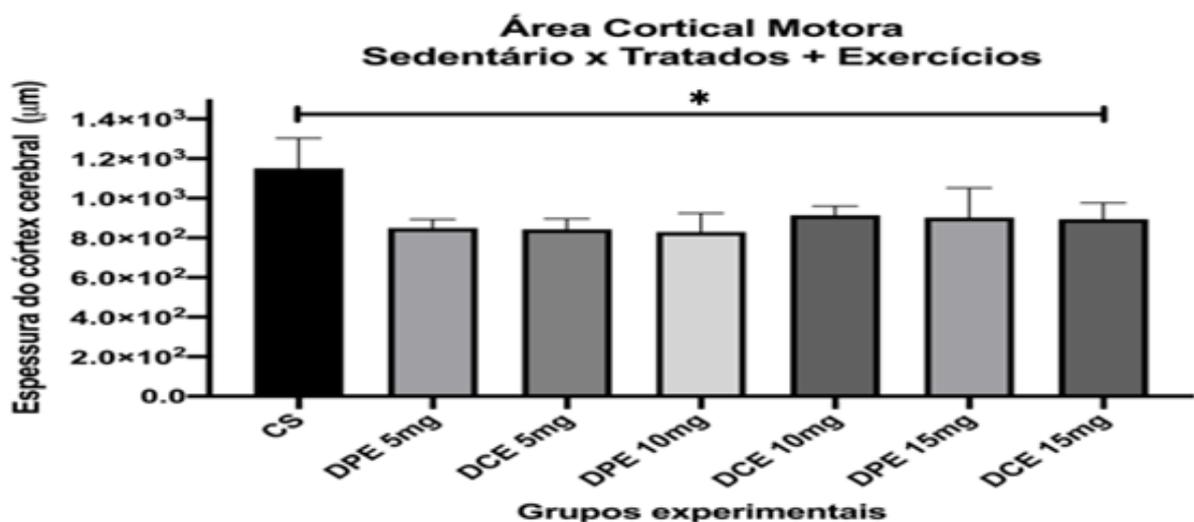
Tabela 14 – Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no volume do córtex cerebral motor (μm). Média \pm desvio padrão da densidade cortical motora, redução neuronal em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	1150,36 \pm 152,62
DPE 5mg	849,57 \pm 43,49	26,15 %	0,0001*
DCE 5mg	842,90 \pm 53,35	26,73 %	0,0001*
DPE 10mg	828,91 \pm 95,59	27,94 %	0,0001*
DCE 10mg	958,97 \pm 85,75	16,64 %	0,0001*
DPE 15mg	1010,27 \pm 155,55	12,18 %	0,0001*
DCE 15mg	945,29 \pm 107,78	17,83 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Gráfico 8 – Média do volume do córtex cerebral motor (μm). Análise comparativa entre os grupos tratados com dois diferentes tipos de esteroides anabolizantes, em suas distintas doses de concentrações 5, 10 e 15mg, que praticaram exercício físico e o grupo CS.



Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

Do mesmo modo, na área cortical sensitiva, houve redução estatisticamente significativa, quando equiparados os grupos: controle sedentário (CS) e os tratados que praticaram exercício (DPE e DCE), em suas diferentes concentrações de doses (5mg, 10mg e 15mg). Desta maneira, observa-se que os grupos tratados/exercitados, apresentaram importantes perdas de volume cortical sensitivo, após o uso crônico de esteroides anabolizantes (GRÁFICO 9). Logo, os resultados dos grupos supracitados foram (expressos em micrômetros): DPE 5mg $978,90 \pm 104,31$; DCE 5mg $919,43 \pm 82,66$; DPE 10mg $853,89 \pm 103,52$; DCE 10mg $1045,83 \pm 71,55$; DPE 15mg $1100,81 \pm 199,53$ e DCE 15mg $991,97 \pm 139,82$, confrontados ao grupo CS que apresentou $1246,04 \pm 119,47$ em sua média. Em vista disso, o córtex sensitivo obteve redução de até 31,47% no grupo DPE 10mg (TABELA 15).

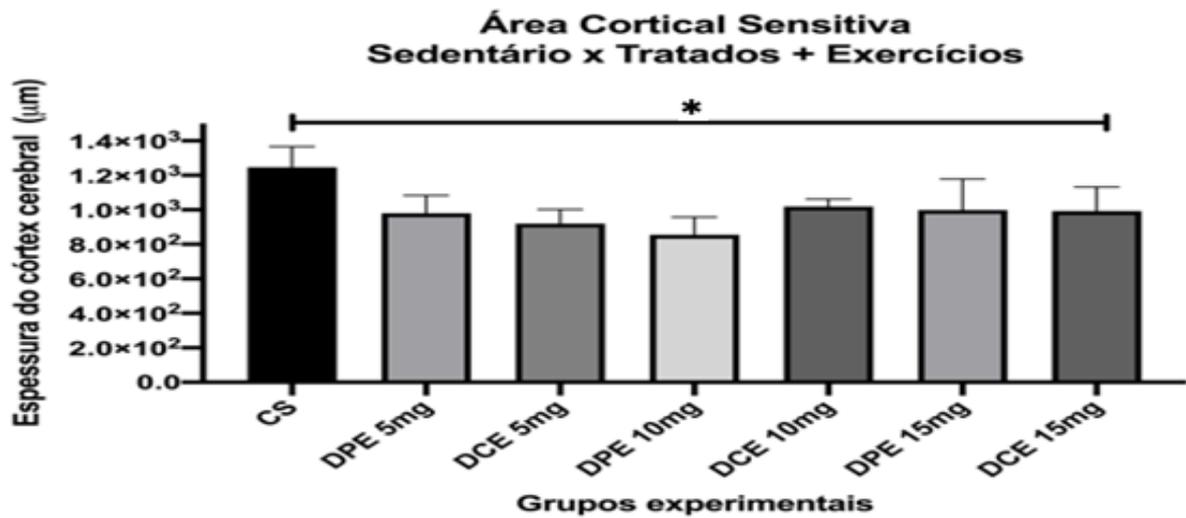
Tabela 15 – Comparação entre o grupo controle sedentário (CS) e os grupos exercícios associados aos tratamentos dos EAA, no volume do córtex cerebral sensitivo (μm). Média \pm desvio padrão da densidade cortical sensitiva, redução neuronal em porcentagem (%), bem como valor de p e nível de significância.

Grupos/Doses	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
CS	$1246,04 \pm 119,47$
DPE 5mg	$978,90 \pm 104,31$	21,44 %	0,0001*
DCE 5mg	$919,43 \pm 82,66$	26,41 %	0,0001*
DPE 10mg	$853,89 \pm 103,52$	31,47 %	0,0001*
DCE 10mg	$1045,83 \pm 71,55$	16,07 %	0,0001*
DPE 15mg	$1100,81 \pm 199,53$	11,66 %	0,0001*
DCE 15mg	$991,97 \pm 139,82$	20,39 %	0,0001*

Fonte: Autores (2022).

Legenda: Onde CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si.

Gráfico 9 – Média do volume da área cortical sensitiva (μm). Análise comparativa entre os grupos tratados com dois diferentes tipos de esteroides anabolizantes, em suas distintas doses de concentrações 5, 10 e 15mg, que praticaram exercício físico e o grupo CS.



Fonte: Autores (2022).

Nota: * Diferença significativa quando comparado ao grupo CS, mas não diferem entre si. Onde: CS = Controle Sedentário, DPE = Cipionato de Testosterona Exercício e DCE = Decanoato de Nandrolona Exercício. Análise de Variância (*One-Way ANOVA*) ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Desde o início do desenvolvimento de um embrião, ocorre a superprodução de células, sendo que em última análise, requer que os elementos demais morram como parte do processo que equilibra o crescimento e a diferenciação. Nas circunstâncias dos sistemas nervoso central e periférico, a apoptose ocorre extensivamente durante o desenvolvimento (DECKWERTH; JOHNSON, 1993). Por outro lado, observa-se que a morte celular inadequada, é a destruição imprevista de uma célula em que nas circunstâncias de condições normais, não estavam destinadas a morrer. A morte celular inapropriada pode desempenhar-se de maneiras diversas, exibindo características necróticas ou apoptóticas, ou até mesmo uma combinação de ambos. Com isso, quando a apoptose é implementada erroneamente sob certas condições estressantes ou de outros métodos de condições anormais, resulta em morte celular que pode desenvolver danos aos tecidos e órgãos (BREDESEN, 1996; ELDADAH; FADEN, 2000; SASTRY; RAO, 2001; THOMPSON, 1995; TROY; SALVESEN, 2002). A forma mais notável de morte celular inadequada é a necrose.

Segundo Kroemer *et al.* (2009), apoptose é processo pelo qual ocorre o arredondamento da célula, retração de pseudópodes, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear (cariorrexe), classicamente com pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas, bolhas na membrana plasmática (mas manutenção de sua integridade até os estágios finais do processo) e engolfamento por fagócitos residentes (*in vivo*). Em contraste, a morte celular necrótica ou necrose é morfologicamente caracterizada por um ganho no volume celular (oncoses), inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e subsequente perda de conteúdos intracelulares. Com detalhes, verificou que as células necróticas se rompem e liberam o conteúdo intracelular desencadeando um mecanismo de resposta inflamatória, enquanto as células apoptóticas são removidas (por fagocitose) antecipadamente de sua ruptura, evitando os danos que o processo inflamatório poderia ocasionar às células vizinhas. Embora existam esses diferentes mecanismos de morte, nem sempre há uma boa distinção clara entre os fenômenos apoptótico e necrótico (HUTCHINS; BARGER, 1998).

A célula neuronal é um tipo celular que está em sua maior parte isento do fluxo diário de nascimento e morte celular, uma vez que, após o período de desenvolvimento, os neurônios pós-mitóticos necessitam ter vida duradoura para manter os circuitos adequados (FRICKER *et al.*, 2018). A exposição de células a substâncias tóxicas, agressivas e fatores ambientais, pode

desencadear o processo de necrose (DING *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 1988). Os fatores apresentados pelos autores vão de encontro com o que, supostamente, pode ter provocado a morte neuronal no locus ceruleus e hipotálamo, nos grupos tratados com esteroides anabolizantes, uma vez que a utilização dos EAA pode ter provocado um estímulo neurotóxico nos neurônios e, conseqüentemente, desencadeou o mecanismo de necrose celular, visto que foi observado uma queda estatisticamente significativa de neurônios nos animais tratados, em contraste com os animais controle, tanto nos sedentários quanto os que praticaram exercício. Esta relação explora a importância desta comparação, refletindo o grau de toxicidade que as células neuronais podem sofrer com o uso indiscriminado destas substâncias.

Nos estudos de Morrison, Sikes e Melloni (2016), demonstrou que ao expor hamsters sírios a anabolizantes durante a adolescência, foi observado um comportamento agressivo aumentado em todos testes de seu experimento, e que múltiplas interações neuroquímicas em nível neurofisiológico são alteradas pela exposição ao EAA em adolescentes. Evidências sugerem que o uso de EAA durante a puberdade e adolescência, período fundamental relacionado ao desenvolvimento, pode ampliar o risco de comportamentos anormais juntamente com distúrbios neurológicos (CUNNINGHAM; LUMIA; MCGINNIS, 2013). Os dados de Hall, Hall e Chapman (2005), apontam que o uso abusivo de EAA pode aumentar a agressividade e causar raiva, delírio, depressão, mania, psicose e sintomas de abstinência, no qual, nota-se que os sintomas psiquiátricos são observados frequentemente em doses crescentes. Diante o exposto, observa-se que os estímulos causados pela exposição precoce e abusiva aos anabolizantes, afetam diretamente o sistema nervoso, visto que os jovens e adolescentes, tornam-se cada vez mais numerosos entre os usuários, sendo perceptíveis as mudanças psiquiátricas observacionais. Estes acontecimentos podem estar relacionados aos efeitos complexos dos esteroides na cascata de reações que são estimuladas no cérebro, principalmente em desenvolvimento, atingindo diferentes áreas cerebrais, incluindo o locus ceruleus e hipotálamo, como demonstrado nos resultados deste estudo, enfatizando o hipotálamo, devido aos efeitos supracitados na literatura, no qual se refere ao centro de reações emocionais e humor.

Homens jovens destacam entre os usuários de anabolizantes, tornando-se prevalência. Além disso, estes usuários apresentaram mais complicações relacionados à raiva, ansiedade, depressão e sua autoestima foi menor entre os não usuários. Também foi possível distinguir que os usuários de anabolizantes eram mais propensos a tomar remédios para saúde mental e uso indevido de substâncias do que os não usuários (GESTSDOTTIR *et al.*, 2021). Portanto, ao relacionar os dados científicos apresentados com os resultados deste estudo, demonstra-se a

importância da interação dos anabolizantes e o cérebro, destacando seus efeitos e consequências, principalmente entre usuários do sexo masculino, público alvo para estas substâncias. Destaca-se ainda os potenciais efeitos que os anabolizantes ocasionam no cérebro, afetando diretamente a sociabilidade, com isso, esses efeitos provavelmente estão conectados ao circuito hipotalâmico, devido às radicais alterações de humor. Desta forma, estes sintomas podem ser explicados pela grave queda de neurônios causados pelos anabolizantes, conforme os dados demonstrados neste estudo, com significativos percentuais de perda na densidade neuronal nos grupos tratados com esteroides anabolizantes.

Dados em animais sugerem que usar anabolizantes altera várias vias neuroquímicas, que o uso de EAA pode levar a comportamentos criminosos, como abuso de drogas, assim como agressão e homicídio que podem ser aleatórios e sem sentido (HALL; HALL; CHAPMAN, 2005). Nos estudos de Hauger *et al.* (2021), foi possível confirmar uma associação entre o uso de EAA, agressão e violência em levantadores de peso, contudo, esta associação é vista principalmente em usuários dependentes de EAA, embora, características de personalidade antissocial são um mediador relevante. Disfunções executivas específicas e características de personalidade, particularmente as associadas a mau controle emocional, empatia reduzida e impulsividade, estão associadas a uma dependência mais grave de EAA na população com transtorno por uso de substâncias (TUS) (SCARTH *et al.*, 2022). Deste modo, evidencia-se que os anabolizantes causam sérios efeitos psíquicos em seus usuários, com importantes mudanças sociais e intelectuais, até mesmo na execução de tarefas básicas e cotidianas. Essas características podem estar relacionadas às consequências que os EAA provocam no cérebro. Entre as causas destes efeitos, provavelmente estão vinculados à morte de neurônios, corroborando com os resultados apontados por este estudo, no qual os grupos tratados com EAA apresentaram significativa queda da densidade de neurônios no locus ceruleus e hipotálamo, conseqüentemente, podendo afetar funções essenciais que estas células supostamente desempenhariam. Desta forma, os dados apresentados pela literatura estão de acordo com as áreas pesquisadas neste estudo, principalmente associando atenção, memória, comportamento, execução de atividades rotineiras, funções relacionadas as áreas deste estudo, como descrito anteriormente.

No estudo de Damião *et al.* (2021), sugere-se que os derivados sintéticos da testosterona têm toxicidade N-metil-D-aspartato (NMDA) aumentada em baixas concentrações e que parte destes substratos não são de aromatase. Diante disso, os resultados expressos neste estudo, indicam que ambos os esteroides, provavelmente, causam efeitos análogos, no qual, percebe-se que os grupos sedentários e tratados, obtiveram significativas quedas de corpos celulares de

neurônios, ou seja, presumidamente, eles afetam o sistema nervoso dos animais por processos neurotóxicos similares, não obtendo diferenças nas distintas concentrações. Portanto, demonstrando que as doses suprafisiológicas, que geralmente são utilizadas por usuários, segundo a literatura, causam efeitos graves e irreversíveis ao cérebro. Acrescenta-se ainda que, os derivados sintéticos da testosterona, podem possuir níveis tóxicos elevados, quando utilizados indiscriminadamente.

Segundo Bjørnebekk *et al.* (2021), conforme as exponenciais evidências dos efeitos adversos à saúde devido ao uso abusivo de EAA, usando a previsão da idade cerebral, foram detectadas evidências de aumento aparente do envelhecimento cerebral em usuários de anabolizantes com uso prolongado e de altas doses, supostamente agregados à dependência e uso exagerado de EAA. Os estudos de Wood e Serpa (2020), sugerem que a testosterona prejudica a flexibilidade cognitiva e demonstra que o uso abusivo de EAA possui potencial para causar danos a função cognitiva em humanos. Assim sendo, os resultados deste estudo estão de acordo com os achados na literatura, pois os anabolizantes em estudo (Cipionato de Testosterona e Decanoato de Nandrolona) provocaram expressivas perdas de neurônios nas áreas em estudo. Assim, observa-se que os EAA estavam promovendo a degeneração neural, devido aos efeitos prejudiciais provocados pela absorção das altas doses e aos possíveis mecanismos neurotóxicos desencadeados pelos EAA.

Estudos preliminares levantaram a probabilidade de que a exposição em longo prazo à doses abusivas de EAA pode causar déficits cognitivos, principalmente na memória visuo-espacial (KANAYAMA *et al.*, 2013). Com isso, ao relacionar os dados deste estudo aos apontados pela literatura, torna-se evidente que os anabolizantes provocam efeitos neurodegenerativos e conseqüentemente afetam funções cerebrais essenciais para manter a qualidade de vida e mente saudável, assim, os resultados apresentados nesta pesquisa apresentam expressivas perdas de corpos de neurônios no locus ceruleus e hipotálamo, da mesma forma, em importantes áreas corticais (motora e sensitiva), que estão associadas à cognição, formação e processamento de memória.

A disfunção hipotalâmica é um fator de risco para doenças neurodegenerativas e essas doenças, por sua vez, promovem alterações adicionais nas células microgлияis hipotalâmicas, que são incapazes de lidar com o processo neurodegenerativo, resultando em danos permanentes nos circuitos neuronais-gliais que controlam a homeostase endócrina, ingestão alimentar e metabolismo corporal, desta maneira, um “ciclo vicioso” pode ser iniciado, podendo aumentar ainda mais as alterações microgлияis e a deterioração da função hipotalâmica (CHOWEN; GARCIA-SEGURA, 2020). Com isso, fica claro a importância dos dados

apresentados neste estudo, demonstrando que os usuários de anabolizantes possivelmente estão mais propensos a desenvolverem doenças neurodegenerativas, visto que, os resultados desta pesquisa identificaram porcentagens consideráveis na queda de corpos neurônios, nos tratamentos com os dois anabolizantes (DP e DC), independente das doses que foram administradas. Logo, pode-se concluir que os usuários de esteroides, estão constantemente colocando suas vidas em risco, principalmente baseados nos efeitos deletérios que os EAA causam no cérebro, deixando sequelas irreparáveis.

Estudos realizados por Damião *et al.* (2012) e Freitas *et al.* (2017), mostraram, respectivamente, uma diminuição no número de corpos celulares de neurônios no córtex e núcleo pálido. Ribeiro *et al.* (2019), encontrou uma diminuição na densidade de corpos celulares de neurônios nos camundongos machos tratados com cipionato de testosterona, mas não no tratamento com estanozolol, enquanto que na região da amígdala basolateral (BLA), os dois esteroides diminuíram a densidade neuronal nas fêmeas. Neste mesmo experimento, outro núcleo da amígdala foi analisado, núcleo ventral posterior (VPN), que da mesma forma apresentou diminuição na densidade de corpos celulares de neurônios com o uso dos dois esteroides, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estas pesquisas apoiam os resultados que foram observados neste estudo, através da análise feita da densidade neuronal do locus ceruleus e do hipotálamo nos ratos machos tratados com esteroides anabolizantes, identificando a diminuição significativa de neurônios em ambos os tratamentos, nos grupos sedentários e exercícios, independentemente de suas concentrações.

Com o objetivo de investigar a relação entre a exposição prolongada aos anabolizantes e a morfometria cerebral, incluindo volumes neuroanatômicos subcorticais e espessura cortical, foram processadas imagens em software específico, comparando os grupos usuários e não usuários. Ao analisar as imagens, os levantadores de peso, que usavam EAA, tinham córtex mais fino em regiões amplas e volumes neuroanatômicos significativamente menores, incluindo massa cinzenta total, córtex cerebral e putâmen, comparados aos levantadores de peso que não usam EAA, demonstrando os efeitos prejudiciais do EAA na estrutura cerebral, as correlações negativas entre o uso de anabolizantes, volume cerebral e a espessura cortical (BJØRNEBEKK *et al.*, 2017). Usuários dependentes de anabolizantes, do sexo masculino, parecem ter córtex mais fino em regiões amplas, especificamente em áreas pré-frontais envolvidas no controle inibitório e regulação emocional, em comparação com usuários de esteroides anabolizantes não dependentes (HAUGER *et al.*, 2019). Desta forma, os dados deste estudo estão de acordo com os dados apontados pela literatura, visto que, ao expor ratos machos Wistar a ambos os esteroides anabolizantes (DP e DC), apresentaram significativas reduções nas regiões cerebrais

corticais: motora (grupo dos animais sedentários) e somatossensorial (grupo dos animais sedentários, e apenas DP 10mg dos animais exercitados), ampliando as hipóteses que o uso indiscriminado de anabolizantes causa atrofia cerebral, devido à morte celular provocada pelos supostos efeitos neurotóxicos dos EAA.

Em relevante estudo comparativo, analisando 47 usuários regulares de academia, que faziam uso de anabolizantes (grupo EAA), e 48 indivíduos que frequentavam academia regularmente, mas não utilizavam anabolizantes (não-EAA), revelaram que o grupo EAA, apresentaram significativamente déficits de memória retrospectiva (RM), de função executiva (FE) e memória prospectiva (PM), quando comparados com o grupo não-EAA, concluindo que o uso de anabolizantes em contexto esportivo recreativo pode estar associado a déficits de RM, FE e PM, apontando que os anabolizantes provavelmente prejudicam a memória cotidiana (M. HEFFERNAN *et al.*, 2015). De acordo com Bjørnebekk *et al.* (2019), os esteroides anabolizantes, usados principalmente com a finalidade de estética e potencialização muscular, podem desenvolver sérias consequências para a saúde, com potenciais danos ao cérebro e na cognição, que o uso de EAA em doses elevadas em longo prazo estava correlacionado a um desempenho cognitivo mais baixo em vários domínios. Deste modo, conforme os estudos supramencionados, os anabolizantes interferem drasticamente nas funções cerebrais essenciais para a vida cotidiana do indivíduo, afetando áreas encefálicas relacionadas à memória, aprendizagem e execução de tarefas básicas para sobrevivência. Diante disso, os resultados observados neste estudo, corroboram com os dados apontados pela literatura, relacionando as áreas de estudo, com as significativas quedas de densidade de corpos de neurônios e perda de volume cortical, nos grupos dos animais sedentários e exercitados, tratados com anabolizantes (DP e DC), evidenciando os efeitos prejudiciais que estas substâncias podem provocar no SNC.

Por muitos anos, os pesquisadores acreditaram que a neurogênese, a formação de novos neurônios através da divisão de células estaminais dentro do cérebro, procederia somente na fase do desenvolvimento embrionário e não seria capaz de desenvolver no cérebro de um adulto. Contudo, com avanço das pesquisas científicas, evidências experimentais mostraram que a neurogênese também ocorre no cérebro de adultos (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015; WHITMAN; GREER, 2009). O exercício físico tem a capacidade de aumentar a neurogênese e função hipocampais, melhorando a cognição e regulando o humor (CHAPMAN *et al.*, 2013; PENNINX *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados do presente estudo demonstraram que a diminuição de neurônios ocorreu em ambos os fármacos estudados mostrando que o exercício físico não causou nenhum benefício ou antagonizou os danos causados pelos esteroides na área em estudo. No entanto, a queda ocorreu aproximadamente na

mesma intensidade que foi observada nos animais sedentários, em proporções bem semelhantes, na hipótese que a toxicidade que envolve os efeitos causados pelos EAA, afetou de forma análoga os neurônios de ambos os grupos, sedentários e exercícios.

Evidências crescentes apontam que novas células nascem no hipotálamo de mamíferos adultos, e que essas células recém-nascidas se diferenciam em neurônios, além disso, outras evidências suportam a hipótese de que um declínio no processo neurogênico hipotalâmico é afetado pela sinalização neuroinflamatória crônica, sendo um fator contribuinte para disfunções no sistema sono-vigília e hipotalâmicas no envelhecimento (KOSTIN *et al.*, 2021). Nas últimas duas décadas, acumularam evidências que provavelmente ocorre neurogênese no hipotálamo de mamíferos adultos, e que os níveis de neurogênese hipotalâmica podem ser regulados por sinais dietéticos, ambientais e hormonais (YOO; BLACKSHAW, 2018). Mediante o exposto, nota-se que a ciência está avançando em seus estudos na hipótese que algumas áreas do cérebro possam desenvolver novos neurônios, mas ressalta que alguns fatores podem influenciar nesta gênese. Portanto, os resultados deste estudo, apontaram para uma redução significativa de neurônios no hipotálamo, exibindo características similares às descritas na literatura, devido os inúmeros efeitos negativos ao organismo causados pelos EAA. Assim foi demonstrado neste estudo, que o Cipionato de Testosterona e o Decanoato de Nandrolona possuem potencial para causar danos degenerativos no hipotálamo, tanto em animais sedentários quanto em animais que praticaram exercício físico, indicando que os danos alavancados pelos anabolizantes sobressaem ao metabolismo neural para o surgimento de novas células. Como já mencionado anteriormente, os resultados deste estudo, também demonstraram que não foi observada atenuação no efeito dos esteroides anabolizantes, pois ambos causaram danos bem similares no hipotálamo, assim como no locus ceruleus.

Praticar exercício físico espontaneamente, aumenta de forma significativa a neurogênese hipocampal (EADIE; REDILA; CHRISTIE, 2005; FARMER *et al.*, 2004). Alguns estudos mostraram que o exercício físico é benéfico para uma série de doenças crônicas e, de fato, ele pode promover alterações moleculares que desviam um estado pró-inflamatório crônico para um estado anti-inflamatório, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (PLISSARI *et al.*, 2019). Por outro lado, em contraste, o estudo demonstrou que igualmente ao grupo dos sedentários, os animais que foram submetidos ao exercício, não obtiveram diferenças estatísticas entre si, frente ao uso dos esteroides anabolizantes, apresentando uma perda neuronal razoavelmente semelhante em todas as concentrações dos esteroides, demonstrando que o exercício não influenciou na resposta da perda neuronal; presumindo que o uso de anabolizantes podem ocasionar a diminuição da quantidade de células neuronais do locus

ceruleus e hipotálamo de cérebro de ratos machos tratados, praticando ou não, exercício físico. Nos estudos de Yahyaei, Nouri e Ramezani (2019), em testes com ratos Wistar, obteve-se diferença significativa entre os grupos tratados com anabolizante (Boldenona) e fizeram exercício e o grupo controle sem exercício, apresentando redução do tecido cerebral, principalmente, quando ocorre o aumento das doses. Diante o exposto foi possível observar que nas áreas corticais: retrosplenial, motora e sensitiva (com exceção do grupo DP 10mg) os grupos que praticaram exercício físico, não apresentaram perda de volume significativa, quando equiparados entre si. Por outro lado, em concordância com a literatura, observou que nas áreas corticais motora e sensitiva, ao confrontar os grupos exercitados (DPE e DCE), independentemente da dose de tratamento, com o grupo controle sedentário (CS), obteve-se expressiva redução de células neuronais, sugerindo que o exercício provavelmente não atenuou os efeitos negativos dos esteroides anabolizantes quando comparados aos animais que não utilizaram anabolizantes e não exercitaram.

Num estudo apontado na literatura, diz também que praticar exercícios físicos de forma regular, causa efeitos protetores em relação à perda de volume cerebral e melhora os níveis de condição física e, são preditores de menor perda de volume cerebral num período de um ano (ERICKSON *et al.*, 2011). No entanto, os resultados do estudo pressupõem que a realização do exercício físico não interferiu positivamente no efeito causado pelos esteroides na destruição dos corpos neuronais no cérebro dos ratos machos, sendo provável que a redução das células neuronais nas áreas pesquisadas, são provenientes das consequências do uso dos esteroides. Assim, nota-se através dos resultados obtidos que os anabolizantes administrados, supostamente, possuem potencial de causar neurotoxicidade nos animais tratados e, conseqüentemente, podem afetar o mecanismo de morte celular dos neurônios, causando sequelas nesse processo.

De acordo com Plissari *et al.* (2019), alguns protocolos experimentais realizados em humanos e animais têm ressaltado que a inflamação e a neuroinflamação são fatores biológicos consideráveis que interagem com estímulos externos e mecanismos neurofisiológicos e podem desencadear o transtorno depressivo maior (TDM), um transtorno psiquiátrico associado a prognósticos diversificados. Desta maneira, a exposição dos animais aos anabolizantes, em doses supra-fisiológicas, possivelmente pode ter provocado exacerbação da substância no organismo, prejudicando as atividades do seu sistema biológico, estimulando a síntese de fatores inflamatórios nos neurônios, por conseguinte sucedendo a morte neuronal. Ao relacionar com o estudo supracitado, observam-se efeitos comportamentais, que estão intimamente

conectados a algumas funções essenciais do hipotálamo, que foi relevantemente afetado ao ser exposto aos esteroides anabolizantes em estudo.

Em um estudo realizado por Zelleroth *et al.* (2019), no qual foram testados quatro tipos diferentes de esteroides: testosterona, nandrolona, estanozolol e trembolona, analisando os prejuízos causados por tais substâncias, verificaram-se que todos os quatro esteroides afetaram negativamente a função mitocondrial e resultou na liberação de lactato desidrogenase (LDH) após exposição repetida. Também foi possível identificar que a testosterona, nandrolona e trembolona causaram seus efeitos tóxicos por indução de apoptose, ao contrário do estanozolol que provavelmente induziu à necrose. Deste modo, podem-se observar as consequências negativas que os esteroides causam ao sistema nervoso quando utilizados abusivamente, o que apoia os resultados deste estudo, no qual, houve diferença da densidade de corpos de neurônios dos grupos testados com ambos esteroides, que por outro lado, através do Ensaio de Tunel, foi possível distinguir que a morte celular ocorreu diferentemente da morte programada. Portanto, a hipótese apoia-se na morte celular necrótica, da mesma maneira aos danos causados por estanozolol, como descrito na literatura.

A excitotoxicidade é uma forma de morte celular que ocorre em neurônios estimulados com aminoácidos excitatórios, por exemplo, o glutamato, que leva à abertura do canal permeável de N- metil- D- aspartato (NMDA), seguido por sobrecarga citosólica de Ca^{+2} e ativação de vias de sinalização letais (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003). Deste modo, excitotoxicidade eventualmente se sobrepõe a outros tipos de morte, como apoptose e necrose (dependendo da intensidade do estímulo inicial), visto que, pela presença de reguladores comuns, como o próprio óxido nítrico (ON) (MELINO *et al.*, 1997). Assim, excitotoxicidade não pode ser considerada como uma modalidade separada de morte celular. Através do estudo, é provável que os efeitos de toxicidade causados por ambos esteroides, possam ter desencadeado lesões nas células neuronais, prejudicando seu ciclo fisiológico, desenvolvendo reações biológicas atípicas que podem desfavorecer a vida celular, por exemplo, o acúmulo da concentração de cálcio, como demonstrado na coloração de Von Kossa, e consequentemente ocorrendo a possível morte celular necrótica.

Segundo os estudos de Cunningham, Giuffrida e Roberts (2009), importantes descobertas foram alcançadas através das pesquisas com esteroides, dentre elas incluem: 1) testosterona aumenta a apoptose e a morte celular em células N27 através do método clássico de receptor andrógeno intracelular; 2) por indução de estresse oxidativo, os andrógenos aumentam a disfunção mitocondrial; 3) testosterona induz ativação proteolítica dependente de caspase-3 de PKC δ , e 4) apoptose por indução de andrógeno não é um efeito neuronal

generalizado. Orlando *et al.* (2007), publicou dados que oferecem a primeira evidência de que os EAA são tóxicos para os neurônios que são estimulados com um insulto excitotóxico. A princípio, a toxicidade pode resultar de um clássico mecanismo genômico mediado por receptores de andrógenos ou, alternativamente, por um mecanismo semelhante a um neuroesteroide, que é independente de receptores de andrógenos. De acordo com os dados de Kanayama, Kaufman e Pope (2018), numerosas linhas de evidência sugerem que a exposição prolongada aos andrógenos em doses supra-fisiológicas, produz efeitos neurotóxicos, propondo a possibilidade de que os usuários de andrógenos, em doses abusivas, possam desenvolver déficits cognitivos de início precoce à medida que envelhecem. Em vista disso, é provável que as propriedades excitotóxicas desenvolvidas pelos EAA, em doses supra-fisiológicas, das quais foram administradas nos animais tratados com esteroides, geraram mecanismos nocivos às células neuronais, desenvolvendo processos moleculares que possam ter ativado a morte celular dos neurônios, porém, sendo ocasionada por suposta necrose.

Dois íons que também estão envolvidos na necrose são magnésio e zinco, através do qual a entrada de magnésio pelo canal do receptor N- metil- D- aspartato (NMDA) e a queda no pH intracelular que segue o influxo de cálcio mediado pelo receptor NMDA, exacerba a morte neuronal necrótica (AUER, 2006; KIM *et al.*, 1999; STOUT *et al.*, 1996). Por outro lado, o zinco, que atua no centro sistema nervoso como um neurotransmissor e neuromodulador, desempenha um papel importante na determinação do modo de morte durante ataques excitotóxicos. Visto que, os resultados expressos pela coloração de Von Kossa, demonstraram a presença do acúmulo de cálcio no interior das células neuronais, para ambos esteroides, sugere-se possível morte celular necrótica, corroborando com os dados da literatura.

A versatilidade do Ca^{2+} como um segundo mensageiro é implicada em uma variedade de processos fisiopatológicos, como: proliferação celular, apoptose, necrose, motilidade e a expressão gênica (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; FORADORI; WEISER; HANDA, 2008; M. VICENCIO *et al.*, 2011). Os neurônios provavelmente são sensíveis, de modo particular, às oscilações de Ca^{2+} (FORADORI *et al.*, 2007), visto que ele controla os mecanismos neuronais essenciais. Mediante o exposto, e com as análises realizadas por este estudo e por seus resultados, as hipóteses para a morte celular ocorrida nas células neuronais do locus ceruleus e hipotálamo nos animais tratados com esteroides anabolizantes, apontam para provável necrose, em virtude do teste imunohistoquímico Ensaio de Tunel não apresentar células apoptóticas em seus resultados, observando-se que as células neuronais nesta região não apresentaram diferenças morfológicas, mantendo-se íntegras.

Modificar a amplitude ou duração dos sinais de Ca^{2+} pode levar à morte celular (VERKHRATSKY; TOESCU, 2003). De acordo com M. Vicencio *et al.* (2011), nos neurônios, o Ca^{2+} regula muitos processos, dentre estes, a expressão gênica incluindo também a liberação de vesículas sinápticas. Níveis superiores de testosterona são geralmente encontrados entre os indivíduos expostos à terapia de reposição de testosterona ou por indivíduos que fazem o uso indiscriminado de EAA. Em concordância, foi observado que concentrações de 1–10 μM de testosterona levam a sinais de Ca^{2+} mais elevados e sustentados que produzem apoptose neuronal (ESTRADA; VARSHNEY; EHRlich, 2006). O cálcio intracelular é reconhecido como um efetor central de necrose (SYNTICHAKI; TAVERNARAKIS, 2003). Segundo Subramaniam e Unsicker (2010) e Bevers e Neumar (2008), a necrose neuronal é predominantemente causada pela hiperativação dos receptores NMDA e influxo excessivo de cálcio na célula. Diante o exposto, e acordado com os dados estabelecidos por este estudo, através da coloração de Von Kossa, de modo que foi possível observar células com características como as descritas no método aplicado, e como alguns dados encontrados na literatura científica, é provável que a redução na densidade neuronal que ocorreu nos animais tratados com ambos esteroides, possa ter sido desenvolvida através do mecanismo de necrose, pela neurotoxicidade e danos irreversíveis que os anabolizantes podem causar nas células neuronais.

O uso de esteroides anabolizantes é uma ameaça à saúde pública, com efeito alarmante na vida dos indivíduos que relatam ter usado. Autoridades, profissionais de saúde e pais que convivem com jovens precisam ser informados sobre os sinais e riscos do uso de anabolizantes, para reduzir futuras implicações negativas (GESTSDOTTIR *et al.*, 2021). Sabe-se que muitos usuários temem ao manifestar sua fraqueza pela atração aos esteroides anabolizantes, por ainda acreditarem que sua força e músculos estão conectados aos “poderes” que os EAA trazem ao seu corpo, que o entusiasmo, empolgação e a energia estão apoiados nestas substâncias, o que aumenta a atração e a vontade de cada vez usar mais e maiores quantidades. Entretanto, estes parâmetros diminuem o despertar destes usuários aos riscos físicos e mentais inclusos a cada dose de EAA, mesmo com fácil acesso às informações, pela internet e redes sociais, mesmo com os avanços nos estudos científicos identificando os malefícios apresentados por estas substâncias. Isto apoia a necessidade de cuidado e amparo a estes usuários, com profissionais de saúde treinados e especializados para auxiliar e educar estes indivíduos de maneira simples e efetiva.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo permitem concluir que tanto o Cipionato de Testosterona (DP) como o Decanoato de Nandrolona (DC) reduzem drasticamente a densidade neuronal no Locus ceruleus e Hipotálamo, independente da dose. Nas áreas corticais, foi possível identificar uma redução no volume do córtex motor e somatossensorial, nos grupos dos animais sedentários (DPS e DCS), também foi possível observar uma redução do córtex das mesmas áreas quando comparados os animais tratados exercitados (DPE e DCE) com o grupo controle sedentário (CS). Além disso, foi possível observar que o exercício não causou nenhum efeito benéfico, no Locus ceruleus e Hipotálamo, em relação aos animais tratados e que praticaram exercício físico, pois estes animais obtiveram aproximadamente os mesmos índices que os animais sedentários. Isso pode ser indício de que os efeitos benéficos alcançados por exercícios na promoção da neurogênese ou auxiliando na eficácia da manutenção celular, não foram atingidos devido ao uso de esteroides, que prejudicaram os processos biológicos celulares neuronais e, conseqüentemente, sua morte.

Paralelamente, foi possível inferir que o mecanismo de morte neuronal ocorreu pelo processo de necrose. Ressalta-se que esta neurotoxicidade alavancada pelo uso indiscriminado de EAA pode provocar danos irreparáveis ao sistema nervoso, prejudicando funções e mecanismos essenciais para a manutenção e sobrevivência das células neuronais.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, G. D.; AMICO, F.; COCIMANO, G.; LIBERTO, A.; MAGLIETTA, F.; ESPOSITO, M.; ROSI, G. L.; DI NUNNO, N.; SALERNO, M.; MONTANA, A. Adverse Effects of Anabolic-Androgenic Steroids: A Literature Review. **Healthcare. MDPI**, Basel, v. 9, n. 1, p. 97, 19 jan. 2021.
- ALTHOBITI, S. D.; ALQURASHI, N. M.; ALOTAIBI, A. S.; ALHARTHI, T. F.; ALSWAT, K. A. Prevalence, Attitude, Knowledge, and Practice of Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Use Among Gym Participants. **Materia socio-medica. National Library of Medicine**, [Bethesda], v. 30, n. 1, p. 49–52, mar. 2018.
- AMBAR, G.; CHIAVEGATTO, S. Anabolic-Androgenic Steroid Treatment Induces Behavioral Disinhibition and Downregulation of Serotonin Receptor Messenger RNA in the Prefrontal Cortex and Amygdala of Male Mice. **Genes, Brain and Behavior**, [New Jersey], v. 8, n. 2, p. 161–173, 1 mar. 2009.
- AUER, R. N. Non-Pharmacologic (Physiologic) Neuroprotection in the Treatment of Brain Ischemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [New York], v. 939, n. 1, p. 271–282, 25 jan. 2006.
- BASARIA, S.; WAHLSTROM, J. T.; DOBS, A. S. Anabolic-Androgenic Steroid Therapy in the Treatment of Chronic Diseases. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Oxford, v. 86, n. 11, p. 5108–5117, 1 nov. 2001.
- BASILE, J. R.; BINMADI, N. O.; ZHOU, H.; YANG, Y.-H.; PAOLI, A.; PROIA, P. Supraphysiological Doses of Performance Enhancing Anabolic-Androgenic Steroids Exert Direct Toxic Effects on Neuron-like Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 7, 2013. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00069/abstract>. Acesso em: 7 abr. 2022.
- BEAR, M. H.; REDDY, V.; BOLLU, P. C. Neuroanatomy, Hypothalamus. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.
- BENARROCH, E. E. Locus Coeruleus. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 373, n. 1, p. 221–232, jul. 2018.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium - a Life and Death Signal. **Nature**, [London], v. 395, n. 6703, p. 645–648, out. 1998.
- BEVERS, M. B.; NEUMAR, R. W. Mechanistic Role of Calpains in Postischemic Neurodegeneration. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [Pennsylvania], v. 28, n. 4, p. 655–673, abr. 2008.
- BHASIN, S.; CALOF, O. M.; STORER, T. W.; LEE, M. L.; MAZER, N. A.; JASUJA, R.; MONTORI, V. M.; GAO, W.; DALTON, J. T. Drug Insight: Testosterone and Selective Androgen Receptor Modulators as Anabolic Therapies for Chronic Illness and Aging. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, [London], v. 2, n. 3, p. 146–159, mar. 2006.
- BHASIN, S.; STORER, T. W.; ASBEL-SETHI, N.; KILBOURNE, A.; HAYS, R.; SINHAHIKIM, I.; SHEN, R.; ARVER, S.; BEALL, G. Effects of Testosterone Replacement with a

Nongenital, Transdermal System, Androderm, in Human Immunodeficiency Virus-Infected Men with Low Testosterone Levels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, United States, v. 83, n. 9, p. 3155–3162, 1 set. 1998.

BIRAN, J.; TAHOR, M.; WIRCER, E.; LEVKOWITZ, G. Role of developmental factors in hypothalamic function. **Frontiers in Neuroanatomy**, [Lausanne], v. 9, 21 abr. 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00047/abstract>. Acesso em: 6 jun. 2022.

BJØRNEBEKK, A.; KAUFMANN, T.; HAUGER, L. E.; KLONTEIG, S.; HULLSTEIN, I. R.; WESTLYE, L. T. Long-Term Anabolic–Androgenic Steroid Use Is Associated With Deviant Brain Aging. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, [Philadelphia], v. 6, n. 5, p. 579–589, maio 2021.

BJØRNEBEKK, A.; WALHOVD, K. B.; JØRSTAD, M. L.; DUE-TØNNESEN, P.; HULLSTEIN, I. R.; FJELL, A. M. Structural Brain Imaging of Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Users and Nonusing Weightlifters. **Biological Psychiatry**, [Amsterdã], v. 82, n. 4, p. 294–302, ago. 2017.

BJØRNEBEKK, A.; WESTLYE, L. T.; WALHOVD, K. B.; JØRSTAD, M. L.; SUNDSETH, Ø. Ø.; FJELL, A. M. Cognitive performance and structural brain correlates in long-term anabolic-androgenic steroid exposed and nonexposed weightlifters. **Neuropsychology**, [Washington], v. 33, n. 4, p. 547–559, 2019.

BREDESEN, D. E. Genetic Control of Neural Cell Apoptosis. **Perspectives on developmental neurobiology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 101–109, 1 jan. 1996.

BURDAKOV, D.; PELEG-RAIBSTEIN, D. The Hypothalamus as a Primary Coordinator of Memory Updating. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 223, p. 112988, set. 2020.

CAMILETTI-MOIRÓN, D.; APARICIO, V. A.; NEBOT, E.; MEDINA, G.; MARTÍNEZ, R.; KAPRAVELOU, G.; ANDRADE, A.; PORRES, J. M.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P. High-Intensity Exercise Modifies the Effects of Stanozolol on Brain Oxidative Stress in Rats. **International Journal of Sports Medicine**, New York, v. 36, n. 12, p. 984–991, nov. 2015.

CARMO, E. C. do; ROSA, K. T.; KOIKE, D. C.; FERNANDES, T.; SILVA JUNIOR, N. D. da; MATTOS, K. C.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C. C.; OLIVEIRA, E. M. de. A associação de esteroide anabolizante ao treinamento físico aeróbio leva a alterações morfológicas cardíacas e perda de função ventricular em ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 137–141, abr. 2011.

CASSILHAS, R. C.; REIS, I. T.; VENÂNCIO, D.; FERNANDES, J.; TUFIK, S.; MELLO, M. T. de. Animal Model for Progressive Resistance Exercise: A Detailed Description of Model and Its Implications for Basic Research in Exercise. **Motriz: Revista de Educação Física**, Rio Claro, v. 19, n. 1, p. 178–184, mar. 2013.

CATLIN, D. Use and abuse of anabolic steroids. **Endocrinology**. Philadelphia, p. 2232–42, 2001.

CECCHETTO, F. R.; DE FARIAS, P. S.; CORRÊA, J. CORPO E GÊNERO NO TATAME: UMA ANÁLISE DO MATERIAL PUBLICADO EM UMA REVISTA ESPECIALIZADA EM ARTES MARCIAIS. [s. l.], p. 13, 2010.

CHAKRABARTY, P.; CEBALLOS-DIAZ, C.; LIN, W.-L.; BECCARD, A.; JANSEN-WEST, K.; MCFARLAND, N. R.; JANUS, C.; DICKSON, D.; DAS, P.; GOLDE, T. E. Interferon- γ Induces Progressive Nigrostriatal Degeneration and Basal Ganglia Calcification. **Nature Neuroscience**, [New York], v. 14, n. 6, p. 694–696, jun. 2011.

CHAPMAN, S. B.; ASLAN, S.; SPENCE, J. S.; DEFINA, L. F.; KEEBLER, M. W.; DIDEHBANI, N.; LU, H. Shorter term aerobic exercise improves brain, cognition, and cardiovascular fitness in aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [Lausanne], v. 5, 2013. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2013.00075/abstract>. Acesso em: 26 abr. 2022.

CHOWEN, J. A.; GARCIA-SEGURA, L. M. Microglia, Neurodegeneration and Loss of Neuroendocrine Control. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 184, p. 101720, jan. 2020.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 413–436, 1 ago. 2003.

CORALINA, C. **Vintém de Cobre: meias confissões de Aninha**. São Paulo: Global Editora, 1997.

CUNNINGHAM, R. L.; GIUFFRIDA, A.; ROBERTS, J. L. Androgens Induce Dopaminergic Neurotoxicity via Caspase-3-Dependent Activation of Protein Kinase C δ . **Endocrinology**, United States, v. 150, n. 12, p. 5539–5548, dez. 2009.

CUNNINGHAM, R. L.; LUMIA, A. R.; MCGINNIS, M. Y. Androgenic Anabolic Steroid Exposure during Adolescence: Ramifications for Brain Development and Behavior. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 350–356, jul. 2013.

DAHNIKE, R.; YOTTER, R. A.; GASER, C. Cortical thickness and central surface estimation. **NeuroImage**, [s. l.], v. 65, p. 336–348, 15 jan. 2013.

DAMIÃO, B.; DE SOUZA, G. G.; ALVES, D.; JUNIOR, W. C. R.; FERNANDES, G. J. M.; ESTEVES, A. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteróides Anabolizantes. **Rev Neurocienc**, [São Paulo], v. 20, n. 1, p. 68–72, 2012.

DAMIÃO, B. **Efeito do uso crônico de esteroides anabolizantes nos parâmetros bioquímicos, hormonais, comportamentais e na quantificação neuronal em ratos Wistar**. 2020. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas. 2020.

DAMIÃO, B.; ROSSI-JUNIOR, W. C.; GUERRA, F. D. R.; MARQUES, P. P.; NOGUEIRA, D. A.; ESTEVES, A. Anabolic Steroids and Their Effects of on Neuronal Density in Cortical Areas and Hippocampus of Mice. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 81, n. 3, p. 537–543, set. 2021.

DARTORA, W. J.; WARTCHOW, K. M.; RODRÍGUEZ ACELAS, A. L. O USO ABUSIVO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. **Revista Cuidarte**, Bucaramanga, v. 5, n. 1, p. 689–693, jun. 2014.

DAVANI-DAVARI, D.; KARIMZADEH, I.; KHALILI, H. The Potential Effects of Anabolic-Androgenic Steroids and Growth Hormone as Commonly Used Sport Supplements on the Kidney: A Systematic Review. **BMC Nephrology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 198, dez. 2019.

DE FIGUEIREDO, R. P. Uma história da testosterona sintética: de Brown Séquard a Rebeca Gusmão. **XXVII Simpósio Nacional de História. Conhecimento histórico e diálogo social. Natal**, p. 12, 2013.

DE RONDE, W.; SMIT, D. L. Anabolic androgenic steroid abuse in young males. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. R102–R111, abr. 2020.

DE ROSE, E. H.; ACL, N. Drogas lícitas e ilícitas. **Ghorayeb N, Barros T. O Exercício**. São Paulo: Atheneu, 1999.

DECKWERTH, T. L.; JOHNSON, E. M. Neurotrophic Factor Deprivation-Induced Death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 679, n. 1 Markers of Ne, p. 121–131, maio 1993.

DING, D.; MOSKOWITZ, S. I.; LI, R.; LEE, S. B.; ESTEBAN, M.; TOMASELLI, K.; CHAN, J.; BERGOLD, P. J. Acidosis Induces Necrosis and Apoptosis of Cultured Hippocampal Neurons. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2000.

DO CARMO, E. C.; FERNANDES, T.; KOIKE, D.; DA SILVA, N. D.; MATTOS, K. C.; ROSA, K. T.; BARRETTI, D.; MELO, S. F. S.; WICHI, R. B.; IRIGOYEN, M. C. C.; DE OLIVEIRA, E. M. Anabolic Steroid Associated to Physical Training Induces Deleterious Cardiac Effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Indianapolis, v. 43, n. 10, p. 1836–1848, out. 2011.

EADIE, B. D.; REDILA, V. A.; CHRISTIE, B. R. Voluntary Exercise Alters the Cytoarchitecture of the Adult Dentate Gyrus by Increasing Cellular Proliferation, Dendritic Complexity, and Spine Density. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 486, n. 1, p. 39–47, 23 maio 2005.

EKLÖF, A.-C.; THURELIUS, A.-M.; GARLE, M.; RANE, A.; SJÖQVIST, F. The Anti-Doping Hot-Line, a Means to Capture the Abuse of Doping Agents in the Swedish Society and a New Service Function in Clinical Pharmacology. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 571–577, 1 nov. 2003.

EL-BABA, R. M.; SCHURY, M. P. Neuroanatomy, Frontal Cortex. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

ELDADAH, B. A.; FADEN, A. I. Caspase Pathways, Neuronal Apoptosis, and CNS Injury. **Journal of Neurotrauma**, United States, v. 17, n. 10, p. 811–829, out. 2000.

ERICKSON, K. I.; VOSS, M. W.; PRAKASH, R. S.; BASAK, C.; SZABO, A.; CHADDOCK, L.; KIM, J. S.; HEO, S.; ALVES, H.; WHITE, S. M.; WOJCICKI, T. R.; MAILEY, E.; VIEIRA, V. J.; MARTIN, S. A.; PENCE, B. D.; WOODS, J. A.; MCAULEY, E.; KRAMER, A. F. Exercise Training Increases Size of Hippocampus and Improves Memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 108, n. 7, p. 3017–3022, 15 fev. 2011.

ESTRADA, M.; VARSHNEY, A.; EHRLICH, B. E. Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 281, n. 35, p. 25492–25501, set. 2006.

FARMER, J.; ZHAO, X.; VAN PRAAG, H.; WODTKE, K.; GAGE, F. H.; CHRISTIE, B. R. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague–dawley rats in vivo. **Neuroscience**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 71–79, 1 jan. 2004.

FERREIRA, U. M. G.; FERREIRA, A. de C. D.; AZEVEDO, A. M. P.; MEDEIROS, R. L. de; SILVA, C. A. B. da. Esteroides anabólicos androgênicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, p. 267–275, 2007.

FERRUCCI, M.; S. GIORGI, F.; BARTALUCCI, A.; L. BUSCETI, C.; FORNAI, F. The Effects of Locus Coeruleus and Norepinephrine in Methamphetamine Toxicity. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 80–94, 1 jan. 2013.

FIGUEIREDO, V. C.; SILVA, P. R. P. da; TRINDADE, R. de S.; ROSE, E. H. D. Doping cosmético: a problemática das aplicações intramusculares de óleos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 17, p. 56–61, fev. 2011.

FISCHL, B.; DALE, A. M. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 97, n. 20, p. 11050–11055, 26 set. 2000.

FORADORI, C. D.; WEISER, M. J.; HANDA, R. J. Non-genomic actions of androgens. **Rapid Actions of Steroid Hormones**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 169–181, 1 maio 2008.

FORADORI, C. D.; WERNER, S. B.; SANDAU, U. S.; CLAPP, T. R.; HANDA, R. J. Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription. **Neuroscience**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 155–164, 12 out. 2007.

FREITAS, A. C. de; DAMIÃO, B.; ALVES, D. M.; RIBEIRO, M.; FERNANDES, G. J. M.; ROSSI JUNIOR, W. C.; ESTEVES, A. Efeitos dos anabolizantes sobre a densidade de neurônios dos núcleos da base. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 213–216, maio 2017.

FRICKER, M.; TOLKOVSKY, A. M.; BORUTAITE, V.; COLEMAN, M.; BROWN, G. C. Neuronal Cell Death. **Physiological Reviews**, [Washington], v. 98, n. 2, p. 813–880, 1 abr. 2018.

FRIEDRICH, J.; MÜCKSCHEL, M.; BESTE, C. Specific Properties of the SI and SII Somatosensory Areas and Their Effects on Motor Control: A System Neurophysiological Study. **Brain Structure and Function**, Germany, v. 223, n. 2, p. 687–699, mar. 2018.

GALGANI, A.; LOMBARDO, F.; DELLA LATTA, D.; MARTINI, N.; BONUCCELLI, U.; FORNAI, F.; GIORGI, F. S. Locus Coeruleus Magnetic Resonance Imaging in Neurological Diseases. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 2, jan. 2021.

GANESAN, K.; RAHMAN, S.; ZITO, P. M. Anabolic Steroids. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

GESTSDOTTIR, S.; KRISTJANSDOTTIR, H.; SIGURDSSON, H.; SIGFUSDOTTIR, I. D. Prevalence, Mental Health and Substance Use of Anabolic Steroid Users: A Population-Based Study on Young Individuals. **Scandinavian Journal of Public Health**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 555–562, jul. 2021.

GHAPHERY, N. A. Performance-Enhancing Drugs. **Orthopedic Clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 433–442, 1 jul. 1995.

GIORGI, F. S.; GALGANI, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; BUSCETI, C. L.; FORNAI, F. The Connections of Locus Coeruleus with Hypothalamus: Potential Involvement in Alzheimer's Disease. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 128, n. 5, p. 589–613, maio 2021.

GOLDMAN, A. L.; POPE, H. G.; BHASIN, S. The Health Threat Posed by the Hidden Epidemic of Anabolic Steroid Use and Body Image Disorders Among Young Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, United States, v. 104, n. 4, p. 1069–1074, 1 abr. 2019.

GONZÁLEZ, B.; HERNANDO, R.; MANSO, R. Anabolic steroid and gender-dependent modulation of cytosolic HSP70s in fast- and slow-twitch skeletal muscle. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 63–71, 1 set. 2000.

GOODNOUGH, L. H.; DINUOSCIO, G. J.; FERGUSON, J. W.; WILLIAMS, T.; LANG, R. A.; ATIT, R. P. Distinct Requirements for Cranial Ectoderm and Mesenchyme-Derived Wnts in Specification and Differentiation of Osteoblast and Dermal Progenitors. **PLOS Genetics**, [San Francisco], v. 10, n. 2, p. e1004152, 20 fev. 2014.

GRÖNBLADH, A.; JOHANSSON, J.; NÖSTL, A.; NYBERG, F.; HALLBERG, M. GH Improves Spatial Memory and Reverses Certain Anabolic Androgenic Steroid-Induced Effects in Intact Rats. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 216, n. 1, p. 31–41, jan. 2013.

GUO, Q.; LIU, S.; WANG, S.; WU, M.; LI, Z.; WANG, Y. Beta-hydroxybutyric acid attenuates neuronal damage in epileptic mice. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 455–459, 1 maio 2019.

HALL, R. C. W.; HALL, R. C. W.; CHAPMAN, M. J. Psychiatric Complications of Anabolic Steroid Abuse. **Psychosomatics**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 285–290, jul. 2005.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. **Sports Medicine**, [London], v. 34, n. 8, p. 513–554, 1 jul. 2004.

HAUGER, L. E.; HAVNES, I. A.; JØRSTAD, M. L.; BJØRNEBEKK, A. Anabolic Androgenic Steroids, Antisocial Personality Traits, Aggression and Violence. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 221, p. 108604, abr. 2021.

HAUGER, L. E.; WESTLYE, L. T.; FJELL, A. M.; WALHOVD, K. B.; BJØRNEBEKK, A. Structural Brain Characteristics of Anabolic–Androgenic Steroid Dependence in Men. **Addiction**, [England], v. 114, n. 8, p. 1405–1415, 2019.

HOBERMAN, J. M.; YESALIS, C. E. The History of Synthetic Testosterone. **Scientific American**, [New York], v. 272, n. 2, p. 76–81, 1995.

HOFFMAN, J. R.; KRAEMER, W. J.; BHASIN, S.; STORER, T.; RATAMESS, N. A.; HAFF, G. G.; WILLOUGHBY, D. S.; ROGOL, A. D. Position Stand on Androgen and Human Growth Hormone Use. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, [s. l.], v. 23, p. S1, ago. 2009.

HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N. A. Medical Issues Associated with Anabolic Steroid Use: Are They Exaggerated? **Journal of sports science & medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 182–193, 1 jun. 2006.

HUTCHINS, J. B.; BARGER, S. W. Why Neurons Die: Cell Death in the Nervous System. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 253, n. 3, p. 79–90, 1998.

IP, E. J.; BARNETT, M. J.; TENEROWICZ, M. J.; KIM, J. A.; WEI, H.; PERRY, P. J. Women and Anabolic Steroids: An Analysis of a Dozen Users. **Clinical Journal of Sport Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 475–481, nov. 2010.

JAVED, K.; REDDY, V.; LUI, F. Neuroanatomy, Cerebral Cortex. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2019.

JERÔNIMO, L.; FRANCO, P.; MARQUES, P.; GUERRA, F.; ROSSI JUNIOR, W.; ESTEVES, A. Effects of Supraphysiological Doses of Anabolic Androgenic Steroids on the Left Ventricles of Male and Female Mice Submitted to Swimming. **Journal of Morphological Sciences**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 01, p. 002–006, mar. 2019.

KANAYAMA, G.; KAUFMAN, M. J.; POPE, H. G. Public Health Impact of Androgens: **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 218–223, jun. 2018.

KANAYAMA, G.; KEAN, J.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Cognitive Deficits in Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Users. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 130, n. 1–3, p. 208–214, jun. 2013.

KAUFMAN, M. J.; JANES, A. C.; HUDSON, J. I.; BRENNAN, B. P.; KANAYAMA, G.; KERRIGAN, A. R.; JENSEN, J. E.; POPE, H. G. Brain and Cognition Abnormalities in Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Users. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 152, p. 47–56, 1 jul. 2015.

KAUFMAN, M. J.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Supraphysiologic-Dose Anabolic-Androgenic Steroid Use: A Risk Factor for Dementia? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 100, p. 180–207, maio 2019.

KÉCIA SILVA, D.; ESTEVES, A.; DA RÉ GUERRA, F.; SOARES, E. A.; ALVES NOGUEIRA, D.; MARQUES, P. P.; ROSSI JUNIOR, W. C. Chronic Use of Anabolic Steroids and the Effects on the Neuronal Density of the Cerebral Cortex and Hippocampus in Mice. **American Journal of Sports Science**, [New York], v. 6, n. 3, p. 122, 2018.

KELLY, S. C.; HE, B.; PEREZ, S. E.; GINSBERG, S. D.; MUFSON, E. J.; COUNTS, S. E. Locus Coeruleus Cellular and Molecular Pathology during the Progression of Alzheimer's Disease. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 8, dez. 2017.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. a018812, set. 2015.

KHROUD, N. K.; REDDY, V.; SAADABADI, A. Neuroanatomy, Locus Ceruleus. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

KIM, E. Y.; KOH, J. Y.; KIM, Y. H.; SOHN, S.; JOE, E.; GWAG, B. J. Zn²⁺ Entry Produces Oxidative Neuronal Necrosis in Cortical Cell Cultures: Zn²⁺-Mediated Oxidative Neuronal Necrosis. **European Journal of Neuroscience**, [Oxford], v. 11, n. 1, p. 327–334, jan. 1999.

KOSTIN, A.; ALAM, M. A.; MCGINTY, D.; ALAM, M. N. Adult Hypothalamic Neurogenesis and Sleep–Wake Dysfunction in Aging. **Sleep**, Oxford, v. 44, n. 2, p. zsaal73, 12 fev. 2021.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, [Roma], v. 16, n. 1, p. 3–11, jan. 2009.

KUMAR, N.; MANNING, T. F.; OSTRY, D. J. Somatosensory Cortex Participates in the Consolidation of Human Motor Memory. **PLOS Biology**, [San Francisco], v. 17, n. 10, p. e3000469, 15 out. 2019.

LEE, N. K.; YANG, J.; CHANG, E. H.; PARK, S. E.; LEE, J.; CHOI, S. J.; OH, W.; CHANG, J. W.; NA, D. L. Intra-Arterially Delivered Mesenchymal Stem Cells Are Not Detected in the Brain Parenchyma in an Alzheimer’s Disease Mouse Model. **PLOS ONE**, [San Francisco], v. 11, n. 5, p. e0155912, 20 maio 2016.

LIMA, P. J.; ROBERTO, S. P.; BRUNO, D.; CRISTINE, F. A.; MEDEIROS, G. J.; FR, G.; COSTA, R. J. W.; ALESSANDRA, E. Use of Steroids and Their Effects on Neuronal Density in Hypothalamus and Amygdala. **Neural Circuits**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 8, 2018.

LUSETTI, M.; LICATA, M.; SILINGARDI, E.; REGGIANI BONETTI, L.; PALMIERE, C. Pathological changes in anabolic androgenic steroid users. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, [s. l.], v. 33, p. 101–104, 1 jul. 2015.

M. HEFFERNAN, T.; BATTERSBY, L.; BISHOP, P.; S. O’NEILL, T. Everyday Memory Deficits Associated with Anabolic-Androgenic Steroid Use in Regular Gymnasium Users. **The Open Psychiatry Journal**, [Netherlands], v. 9, n. 1, 29 maio 2015. Disponível em: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOPIJ-9-1>. Acesso em: 7 jun. 2022.

M. VICENCIO, J.; ESTRADA, M.; GALVIS, D.; BRAVO, R.; E. CONTRERAS, A.; ROTTER, D.; SZABADKAI, G.; A. HILL, J.; A. ROTHERMEL, B.; JAIMOVICH, E.; LAVANDERO, S. Anabolic Androgenic Steroids and Intracellular Calcium Signaling: A Mini Review on Mechanisms and Physiological Implications. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [Sharjah], v. 11, n. 5, p. 390–398, 1 maio 2011.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological Tools in Biomedical Research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469–486, dez. 2003.

MAZZEO, F. Anabolic Steroid use in Sports and in Physical Activity: Overview and Analysis. **Sport Mont**, [Montenegro], v. 16, n. 3, p. 113–118, 1 out. 2018.

MELINO, G.; BERNASSOLA, F.; KNIGHT, R. A.; CORASANITI, M. T.; NISTIC, G.; FINAZZI-AGR, A. S-Nitrosylation Regulates Apoptosis. **Nature**, [London], v. 388, n. 6641, p. 432–433, jul. 1997.

MELNIK, B.; JANSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of Anabolic-Androgenic Steroids and Bodybuilding Acne: An Underestimated Health Problem. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 110–117, 2007.

MILCZAREK, M. M.; VANN, S. D. The Retrosplenial Cortex and Long-Term Spatial Memory: From the Cell to the Network. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [s. l.], v. 32, p. 50–56, abr. 2020.

MITCHELL, A. S.; CZAJKOWSKI, R.; ZHANG, N.; JEFFERY, K.; NELSON, A. J. D. Retrosplenial Cortex and Its Role in Spatial Cognition. **Brain and Neuroscience Advances**, [s. l.], v. 2, p. 239821281875709, 1 jan. 2018.

MORRISON, T. R.; SIKES, R. W.; MELLONI, R. H. Anabolic Steroids Alter the Physiological Activity of Aggression Circuits in the Lateral Anterior Hypothalamus. **Neuroscience**, [s. l.], v. 315, p. 1–17, fev. 2016.

NARAYANAN, R.; MOHLER, M. L.; BOHL, C. E.; MILLER, D. D.; DALTON, J. T. Selective Androgen Receptor Modulators in Preclinical and Clinical Development. **Nuclear Receptor Signaling**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. nrs.06010, 1 jan. 2008.

NORTON, G. R.; TRIFUNOVIC, B.; WOODIWISS, A. J. Attenuated β -Adrenoceptor-Mediated Cardiac Contractile Responses Following Androgenic Steroid Administration to Sedentary Rats. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 310–316, 1 jan. 2000.

ORLANDO, R.; CARUSO, A.; MOLINARO, G.; MOTOLESE, M.; MATRISCIANO, F.; TOGNA, G.; MELCHIORRI, D.; NICOLETTI, F.; BRUNO, V. Nanomolar Concentrations of Anabolic–Androgenic Steroids Amplify Excitotoxic Neuronal Death in Mixed Mouse Cortical Cultures. **Brain Research**, [s. l.], v. 1165, p. 21–29, 24 ago. 2007.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of Cell Death: The Calcium–Apoptosis Link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [London], v. 4, n. 7, p. 552–565, 1 jul. 2003.

OSTA, R. E. Anabolic Steroids Abuse and Male Infertility. [s. l.], p. 8, 2016.

PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic Androgenic Steroids: A Survey of 500 Users. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, [Indianapolis], v. 38, n. 4, p. 644–651, abr. 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Inc, 2007.

PENNINX, B. W. J. H.; REJESKI, W. J.; PANDYA, J.; MILLER, M. E.; DI BARI, M.; APPLGATE, W. B.; PAHOR, M. Exercise and Depressive Symptoms: A Comparison of Aerobic and Resistance Exercise Effects on Emotional and Physical Function in Older Persons With High and Low Depressive Symptomatology. **The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences**, [Oxford], v. 57, n. 2, p. P124–P132, 1 mar. 2002.

PEREIRA, A. C.; HUDDLESTON, D. E.; BRICKMAN, A. M.; SOSUNOV, A. A.; HEN, R.; MCKHANN, G. M.; SLOAN, R.; GAGE, F. H.; BROWN, T. R.; SMALL, S. A. An *in Vivo* Correlate of Exercise-Induced Neurogenesis in the Adult Dentate Gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 104, n. 13, p. 5638–5643, 27 mar. 2007.

PERRY, J. C.; SCHUETZ, T. M.; MEMON, M. D.; FAIZ, S.; CANCAREVIC, I. Anabolic Steroids and Cardiovascular Outcomes: The Controversy. **Cureus**, [California], 22 jul. 2020. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/36805-anabolic-steroids-and-cardiovascular-outcomes-the-controversy>. Acesso em: 6 jun. 2022.

PIRAU, L.; LUI, F. Frontal Lobe Syndrome. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.

PLISSARI, M. E.; BERTOLLO, A. G.; SILVA, R. S. da; QUEVEDO, J. L. de; RÉUS, G. Z.; IGNÁCIO, Z. M. Exercício Físico e a Neuroinflamação no Transtorno Depressivo Maior. **Anais do SEPE - Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, [s. l.], v. 9, n. 1, 17 set. 2019. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/SEPEUFFS/article/view/13330>. Acesso em: 7 jun. 2022.

POMARA, C.; NERI, M.; BELLO, S.; FIORE, C.; RIEZZO, I.; TURILLAZZI, E. Neurotoxicity by Synthetic Androgen Steroids: Oxidative Stress, Apoptosis, and Neuropathology: A Review. **Current Neuropharmacology**, [Sharjah], v. 13, n. 1, p. 132–145, 1 jan. 2015.

POPE, H. G., Jr; KATZ, D. L. Psychiatric and Medical Effects of Anabolic-Androgenic Steroid Use: A Controlled Study of 160 Athletes. **Archives of General Psychiatry**, [Chicago], v. 51, n. 5, p. 375–382, 1 maio 1994.

POPE, H. G., Jr; KOURI, E. M.; HUDSON, J. I. Effects of Supraphysiologic Doses of Testosterone on Mood and Aggression in Normal Men: A Randomized Controlled Trial. **Archives of General Psychiatry**, [Chicago], v. 57, n. 2, p. 133–140, 1 fev. 2000.

POPE, H. G., Jr.; WOOD, R. I.; ROGOL, A.; NYBERG, F.; BOWERS, L.; BHASIN, S. Adverse Health Consequences of Performance-Enhancing Drugs: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, United States, v. 35, n. 3, p. 341–375, 1 jun. 2014.

POPE, H. G.; KATZ, D. L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **The American Journal of Psychiatry**, Washington, v. 145, n. 4, p. 487–490, 1988.

RABINOWICZ, T.; PETETOT, J. M.-C.; GARTSIDE, P. S.; SHEYN, D.; SHEYN, T.; DE COURTEN-MYERS, G. M. Structure of the Cerebral Cortex in Men and Women. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, San Francisco, v. 61, n. 1, p. 46–57, jan. 2002.

RAJU, H.; TADI, P. Neuroanatomy, Somatosensory Cortex. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.

REDONDO, R. L.; MORRIS, R. G. M. Making Memories Last: The Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. **Nature Reviews Neuroscience**, [London], v. 12, n. 1, p. 17–30, jan. 2011.

RIBEIRO, B.; DORES, H.; RÊGO, C.; MILHEIRO, J.; ESCALEIRA, R.; CORREIA, O. Anabolic-Androgenic Steroid Use in Sports, Health, and Society. **Revista de Medicina Desportiva Informa**, [São Mamed de Infesta], v. 12, n. 6, p. 23–30, 1 nov. 2021.

RIBEIRO, M.; FREITAS, A.; DAMIÃO, B.; ROSSI, W. C.; GUERRA, F. da R.; SOARES, E. A.; MARQUES, P. P.; ESTEVES, A. Effects of Supraphysiological Doses of Testosterone Cypionate and Stanozolol on Neuronal Density of Basolateral and Medial Amygdala and on the Anxious Behavior of Mice. **Journal of Morphological Sciences**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 02, p. 115–121, jun. 2019.

RIBEIRO, P. C. P. O uso indevido de substâncias: esteroides anabolizantes e energéticos. **Adolescência Latinoamericana**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 97–101, 2001.

ROWLEY, C. D.; BAZIN, P.-L.; TARDIF, C. L.; SEHMBI, M.; HASHIM, E.; ZAHARIEVA, N.; MINUZZI, L.; FREY, B. N.; BOCK, N. A. Assessing intracortical myelin in the living human brain using myelinated cortical thickness. **Frontiers in Neuroscience**, [Lausanne], v. 9, 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2015.00396>. Acesso em: 25 abr. 2022.

SAMUELS, E. R.; SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. **Current neuropharmacology**, [Sharjah], v. 6, n. 3, p. 235–253, 2008a.

SAMUELS, E. R.; SZABADI, E. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part II: Physiological and Pharmacological Manipulations and Pathological Alterations of Locus Coeruleus Activity in Humans. **Current neuropharmacology**, [Sharjah], v. 6, n. 3, p. 254–285, set. 2008b.

SANTOS, A. M.; DA ROCHA, M. S. P.; DA SILVA, M. F. Illicit Use and Abuse of Anabolic-Androgenic Steroids Among Brazilian Bodybuilders. **Substance Use & Misuse**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 742–748, 7 abr. 2011.

SASTRY, P. S.; RAO, K. S. Apoptosis and the Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 1–20, 25 dez. 2001.

SCARTH, M.; BJØRNEBEKK, A. Androgen Abuse and the Brain. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 604–614, dez. 2021.

SCARTH, M.; HAVNES, I. A.; JØRSTAD, M. L.; MCVEIGH, J.; VAN HOUT, M. C.; WESTLYE, L. T.; TORGENSEN, S.; BJØRNEBEKK, A. Severity of Anabolic Steroid Dependence, Executive Function, and Personality Traits in Substance Use Disorder Patients in Norway. **Drug and Alcohol Dependence**, [s. l.], v. 231, p. 109275, fev. 2022.

SCHWINGEL, P. A.; COTRIM, H. P.; SALLES, B. R.; ALMEIDA, C. E.; DOS SANTOS JR, C. R.; NACHEF, B.; ANDRADE, A. R.; ZOPPI, C. C. Anabolic-Androgenic Steroids: A Possible New Risk Factor of Toxicant-Associated Fatty Liver Disease. **Liver International**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 348–353, 2011.

SCOTT, M. L. J.; THACKER, N. A. Robust Tissue Boundary Detection for Cerebral Cortical Thickness Estimation. (J. S. Duncan, G. Gerig). Em: *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2005*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. p. 878–885.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 1355–1390, 1 set. 2001.

SHEEHAN, D. C.; HRAPCHAK, B. B. Theory and Practice of Histotechnology, ; Columbus. OH: Battelle, [s. l.], p. 190–192, 1980.

SMIT, D. L.; DE RONDE, W. Outpatient clinic for users of anabolic androgenic steroids: an overview. **Neth J Med**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 167, 2018.

STECCO, C.; PORZIONATO, A.; MACCHI, V.; SARASIN, G.; CALCAGNO, A.; PARENTI, A.; DE CARO, R. Detection of Apoptosis in Human Brainstem by TUNEL Assay. **Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, [Italy], v. 110, n. 4, p. 255–260, 1 out. 2005.

STOUT, A. K.; LI-SMERIN, Y.; JOHNSON, J. W.; REYNOLDS, I. J. Mechanisms of Glutamate-Stimulated Mg²⁺ Influx and Subsequent Mg²⁺ Efflux in Rat Forebrain Neurones in Culture. **The Journal of Physiology**, [London], v. 492, n. 3, p. 641–657, 1 maio 1996.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. ERK and Cell Death: ERK1/2 in Neuronal Death: ERK1/2 in Neuronal Death. **FEBS Journal**, [Oxford], v. 277, n. 1, p. 22–29, jan. 2010.

SUBRAMANIAM, S.; ZIRRGIEBEL, U.; VON BOHLEN UND HALBACH, O.; STRELAU, J.; LALIBERTÉ, C.; KAPLAN, D. R.; UNSICKER, K. ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 165, n. 3, p. 357–369, 3 maio 2004.

SWANSON, L. W.; LICHTMAN, J. W. From Cajal to Connectome and Beyond. **Annual Review of Neuroscience**, [San Mateo], v. 39, n. 1, p. 197–216, 8 jul. 2016.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The Biochemistry of Neuronal Necrosis: Rogue Biology? **Nature Reviews Neuroscience**, [London], v. 4, n. 8, p. 672–684, ago. 2003.

SZABADI, E. Functional Neuroanatomy of the Central Noradrenergic System. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 659–693, ago. 2013.

TANEHKAR, F.; RASHIDY-POUR, A.; VAFAEI, A. A.; SAMENI, H. R.; HAGHIGHI, S.; MILADI-GORJI, H.; MOTAMEDI, F.; AKHAVAN, M. M.; BAVARSAD, K. Voluntary exercise does not ameliorate spatial learning and memory deficits induced by chronic administration of nandrolone decanoate in rats. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 158–165, 1 jan. 2013.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. **Science**, [Washington], v. 267, n. 5203, p. 1456–1462, 10 mar. 1995.

TODD, T. P.; FOURNIER, D. I.; BUCCI, D. J. Retrosplenial Cortex and Its Role in Cue-Specific Learning and Memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 107, p. 713–728, dez. 2019.

TREDICI, K. D.; BRAAK, H. Dysfunction of the Locus Coeruleus–Norepinephrine System and Related Circuitry in Parkinson’s Disease-Related Dementia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, [London], v. 84, n. 7, p. 774–783, 1 jul. 2013.

TROY, C. M.; SALVESEN, G. S. Caspases on the Brain. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 145–150, 15 jul. 2002.

VAN DIJK, K. D.; BERENDSE, H. W.; DRUKARCH, B.; FRATANTONI, S. A.; PHAM, T. V.; PIERSMA, S. R.; HUISMAN, E.; BREVÉ, J. J. P.; GROENEWEGEN, H. J.; JIMENEZ, C. R.; VAN DE BERG, W. D. J. The Proteome of the Locus Ceruleus in Parkinson's Disease: Relevance to Pathogenesis: Locus Ceruleus Proteomics in Parkinson's Disease. **Brain Pathology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 485–498, jul. 2012.

VANN, S. D.; AGGLETON, J. P.; MAGUIRE, E. A. What Does the Retrosplenial Cortex Do? **Nature Reviews Neuroscience**, [London], v. 10, n. 11, p. 792–802, nov. 2009.

VENÂNCIO, D. P.; NÓBREGA, A. C. L. da; TUFIK, S.; MELLO, M. T. de. Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 191–195, jun. 2010.

VERCRUYSSE, P.; VIEAU, D.; BLUM, D.; PETERSÉN, Å.; DUPUIS, L. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [Lausanne], v. 11, p. 2, 19 jan. 2018.

VERKHRATSKY, A.; TOESCU, E. C. Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Homeostasis and Neuronal Death. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 351–361, out. 2003.

VORONA, E.; NIESCHLAG, E. Adverse effects of doping with anabolic androgenic steroids in competitive athletics, recreational sports and bodybuilding. **Minerva Endocrinology**, [Italy], v. 43, n. 4, nov. 2018. Disponível em: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R07Y2018N04A0476>. Acesso em: 6 jun. 2022.

WADE, N. Anabolic Steroids: Doctors Denounce Them, but Athletes Aren't Listening. **Science**, [Washington], 30 jun. 1972. Disponível em: <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.176.4042.1399>. Acesso em: 12 abr. 2022.

WALKER, N. I.; HARMON, B. V.; GOBÉ, G. C.; KERR, J. F. Patterns of Cell Death. **Methods and achievements in experimental pathology**, [s. l.], v. 13, p. 18–54, 1 jan. 1988.

WHITMAN, M. C.; GREER, C. A. Adult neurogenesis and the olfactory system. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 162–175, 1 out. 2009.

WIEGERT, J. S.; BADING, H. Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: A link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. **Ca²⁺ signalling and gene regulation**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 296–305, 1 maio 2011.

WILSON, J. D. Androgen Abuse by Athletes. **Endocrine Reviews**, [Washington], v. 9, n. 2, p. 181–199, 1 maio 1988.

WOOD, R. I.; SERPA, R. O. Anabolic-Androgenic Steroid Abuse and Cognitive Impairment: Testosterone IMPAIRS Biconditional Task Performance in Male Rats. **Behavioural Brain Research**, Los Angeles, v. 379, p. 112339, fev. 2020.

WU, F. C. W. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1289–1292, 1 jul. 1997.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F.; CURRIE, A. R. Cellular Events in the Adrenal Cortex Following ACTH Deprivation. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. Pix, jan. 1972.

YAHYAEI, B.; NOURI, M.; RAMEZANI, M. The effects of anabolic steroids boldenone with 8 weeks aerobic exercise on histopathological changes in cerebellum male wistar rats. **Journal of Sabzevar University of Medical Sciences**, [Iran], v. 25, n. 6, p. 885–894, 21 jan. 2019.

YAMAGUCHI, H.; SHEN, J. Histological Analysis of Neurodegeneration in the Mouse Brain. *Em: MCCALL, K.; KLEIN, C. Necrosis: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, [s. l.], 2013. p. 91–113.

YESALIS, C. E.; KENNEDY, N. J.; KOPSTEIN, A. N.; BAHRKE, M. S. Anabolic-Androgenic Steroid Use in the United States. **JAMA**, [Canada], v. 270, n. 10, p. 1217–1221, 8 set. 1993.

YESALIS, C. E.; WRIGHT, J. E.; BAHRKE, M. S. Epidemiological and Policy Issues in the Measurement of the Long Term Health Effects of Anabolic-Androgenic Steroids. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 129–138, 1 set. 1989.

YOO, S.; BLACKSHAW, S. Regulation and Function of Neurogenesis in the Adult Mammalian Hypothalamus. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 170, p. 53–66, nov. 2018.

YOSHIDA, E. M.; KARIM, M. A.; SHAIKH, J. F.; SOOS, J. G.; ERB, S. R. At What Price, Glory? Severe Cholestasis and Acute Renal Failure in an Athlete Abusing Stanozolol. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, [Ottawa], v. 151, n. 6, p. 791–793, 15 set. 1994.

ZAYIA, L. C.; TADI, P. Neuroanatomy, Motor Neuron. **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.

ZELLEROTH, S.; NYLANDER, E.; NYBERG, F.; GRÖNBLADH, A.; HALLBERG, M. Toxic Impact of Anabolic Androgenic Steroids in Primary Rat Cortical Cell Cultures. **Neuroscience**, [s. l.], v. 397, p. 172–183, 15 jan. 2019.

ANEXO A – Comprovante Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37120-000
 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito do uso crônico de esteroides anabolizantes nos parâmetros bioquímicos, hormonais e comportamentais e na quantificação neuronal em ratos Wistar” registrada com o nº 18/2016, sob a responsabilidade de Maria Rita Rodrigues – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em 30/06/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	30/06/2016 a 25/04/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	112
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 30 de junho de 2016.

Estela Regina de Oliveira

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira

Coordenadora CEUA-UNIFAL