

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - MG

ARIANE CRISTINE DE FREITAS

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE
NEURÔNIOS NOS NÚCLEOS DA BASE E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES**

ALFENAS/MG

2014

ARIANE CRISTINE DE FREITAS

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE
NEURÔNIOS NOS NÚCLEOS DA BASE E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bioiências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Esteves.

ALFENAS/MG

2014

Freitas, Ariane Cristine de.

Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nos núcleos da base e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteróides anabolizantes / Ariane Cristine de Freitas, Alfenas, MG - 2014.

69 f. -

Orientadora: Alessandra Esteves.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Anabolizantes. 2. Neurônios. 3. Núcleos da base. 4. Pesquisa comportamental. I. Esteves, Alessandra. II. Título.

CDD 612.82

ARIANE CRISTINE DE FREITAS

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS
CELULARES DE NEURÔNIOS NOS NÚCLEOS DA BASE
E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTEROIDES
ANABOLIZANTES**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação abaixo apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas-MG.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: 22/08/14

Prof. *Alexandra Osteros*
Instituição: *UNIFAL-MG*

Assinatura: *Alexandra Osteros*

Prof. *Amo Flávio Carvalho*
Instituição: *UNIFEOD*

Assinatura: *Amo Flávio Carvalho*

Prof. *RENATO RIZO VENTURA*
Instituição: *UNIFAL-MG*

Assinatura: *Renato Rizo Ventura*

Dedico aos meus pais, Marisa e Heidimar, pelo apoio incondicional, carinho e paciência; ao meu irmão, Mairon, pelo afeto e pela força de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ouvir minhas orações e atendê-las sempre que possível e por me conceder paciência e força nas horas que eu mais precisei.

Aos meus pais, Marisa e Heidimar, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, por nunca me deixarem cair nas horas mais difíceis, pelo carinho e paciência, e por confiarem em mim até o final. Ainda temos muitas batalhas pela frente juntos. Amo vocês.

Ao meu irmão, Mairon, pela compreensão de sempre, pelo carinho, apoio e pelos conselhos de sempre.

Ao João Batista, que não acompanhou desde o início, mas que me deu forças na etapa mais difícil desse trabalho. Obrigada pelo amor, pelos incentivos, pelo carinho e pela paciência de sempre.

À minha orientadora, Alessandra, primeiramente por acreditar em mim desde a graduação; pela atenção incondicional de todos esses mais de quatro anos juntas, pelos conselhos, pelo carinho e pela amizade. Sem você eu jamais conseguiria.

Ao meu co-orientador, Wagner, que foi o grande idealizador desse trabalho e contribuiu muito com seus conselhos e experiência.

Aos meus companheiros do Laboratório de Anatomia, Bruno, Dauanda, Juliana e Débora pelo companheirismo e pelo belo trabalho de equipe que ainda estamos fazendo. Mas principalmente à Melissa que sempre que precisei esteve à disposição; obrigada pela atenção e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório, D. Cida e Pit, que me ajudaram muito nos experimentos e no processamento. E aos professores João Carvalho, Geraldo, Flávia e Evelise que sempre estiveram à disposição para o que eu precisasse.

Aos 60 animais utilizados nesse trabalho, que sem eles não conseguiríamos encontrar dados tão valiosos para o futuro das Ciências e bem da humanidade.

Às minhas amigas e companheiras em Alfenas, Carolina, Cintia, Eloisa e Tamires pelo apoio de sempre, pela amizade verdadeira e por sempre estarem presentes nas alegrias e nas tristezas.

À Universidade Federal de Alfenas por dar todo o suporte necessário para a minha formação acadêmica.

E a todos que, apesar de não terem sido mencionados aqui, contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

RESUMO

Nas últimas décadas os Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAAs) vêm sendo utilizados por atletas de elite, em maior parte, aqueles envolvidos em esportes de força e velocidade, para melhora do desempenho físico nas competições. Porém, o abuso destes produtos passou a ser feito por frequentadores de academias, mais interessados nas alterações provocadas na composição corporal, observados com o aumento da massa magra e na redução da gordura subcutânea. Pouco se sabe sobre a atuação dos EAA no cérebro humano, havendo alterações no comportamento agressivo, ansiedade e depressão. Resolvemos então estudar a perda neuronal pelo uso e abuso de Esteróides Anabolizantes em camundongos. Para isso utilizamos 60 camundongos da linhagem Swiss, sendo 30 machos e 30 fêmeas, vindos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Um grupo de 20 animais foi tratado com Deposteron® (Cipionato de Testosterona); outro grupo de 20 animais foi tratado com Winstrol Depot® (stanozolol); e um último grupo de 20 animais foi tratado com salina para o grupo controle. Todos foram submetidos à natação por 15 minutos. Após a fase de tratamento, os animais foram submetidos a três testes comportamentais: análise de ansiedade, memória e reconhecimento de objetos e atividade motora em campo aberto. Finalizado o tratamento e os testes, os animais foram sacrificados através do método de inalação de Alotano®. Retiramos os encéfalos e estes foram armazenados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas. De cada encéfalo foram retiradas amostras homotípicas da região média do cérebro em cortes frontais para que possamos avaliar as áreas então estabelecidas para este estudo. Os resultados das análises da estimativa dos perfis celulares de corpos de neurônios mostraram que houve uma diminuição do número de perfis no núcleo pálido dos animais tratados com Winstrol Depot®. As análises dos testes comportamentais mostraram que a administração de EAAs nos animais gerou um quadro de ansiedade e apatia, e também uma diminuição da capacidade de reconhecimento de objetos. Por outro lado, não alterou a capacidade motora e nem a memória recente desses animais tratados. Em conjunto, esses resultados nos permite inferir que o uso inadequado e sem orientação médica de EAAs pode levar a degenerações celulares, perda das atividades cerebrais e alterações comportamentais graves ao usuário de tal fármaco.

Palavras-chave: Anabolizantes. Densidade. Neurônios. Núcleos da Base. Análise Comportamental.

ABSTRACT

In the last decades, Anabolic-Androgenic Steroids (AAS) or Anabolic Steroids have been used mostly by elite athletes involved in sports that require strength and speed in order to improve their physical performance in competitions. Nevertheless, the abuse of these drugs has been also expanded to gym customers interested in body composition alterations seen by means of lean body mass increase and subcutaneous fat reduction. Few are known about AAS action in human brain, but there are evidences of changes in aggressive behavior, anxiety and depression. Thus, we aimed to study the neuronal loss by the use and abuse of AAS in mice. For doing so, we used 60 Swiss mice, 30 males and 30 females, proceeding from the Central Biotery of the Alfenas Federal University. A group of 20 animals was treated with testosterone cypionate (Deposteron®); another group of other 20 animals was treated with stanozolol (Winstrol Depot®); and a control group involving other 20 animals was treated with saline solution. All animals of the three groups were put under daily 15-minute swimming exercise during 30 days of treatment in an attempt to generate the same stress conditions that a physical exercise. After treatment, all animals were submitted to three behavioral tests: anxiety analysis, memory and recognition of objects and motor activity in the open field. Ending treatment and tests, the specimens were euthanized by halothane inhalation. Their brains were withdrawn and stored in 4% formaldehyde solution for three weeks. From each brain we took homotypic transverse section samples from its middle area to evaluate the areas proposed for our study. The results of estimated profile analyses of neuron cell bodies showed that there was a decrease of their number in pallidum of animals treated with Winstrol Depot®. Besides that, behavioral tests analyses confirmed that AAS administration in these animals caused anxiety and apathy and a decrease in the ability of recognizing objects; on the other hand, we do not observed change in motor ability nor in recent memory of animals so treated. Such results allowed to conclude that the abuse of AAS, without medical orientation, can lead us to cell degeneration, cerebral and cognitive activity loss and severe behavioral changes.

Key words: Anabolic Steroids. Density. Neurons. Basal nuclei. Behavior.

**“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado
é alguém que acredite que ele possa ser
realizado.”**

(Roberto Shinyashiki)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos representantes das três principais classes de EAA.....	22
Figura 2 - Estruturas químicas dos representantes das três principais classes de EAA.....	22
Figura 3 - Caixa plástica utilizada para a natação.....	33
Figura 4 - Aparato do Labirinto em Cruz Elevado.....	34
Figura 5 - Aparato utilizado para o teste de memória de reconhecimento de objetos.....	37
Figura 6 - Aparato utilizado para o teste do Campo aberto.....	38
Figura 7 - Corte frontal de um cérebro de camundongo.....	39
Figura 8 - Imagem representativa do Counting Frame.....	40
Figura 9 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo.....	41
Figura 10 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo.....	41
Figura 11 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo.....	42
Figura 12 - Gráficos demonstrando a taxa de entrada nos braços abertos do LCE.....	44
Figura 13 - Gráficos demonstrando a taxa de entrada nos braços fechados do LCE.....	45
Figura 14 - Gráficos demonstrando a permanência nos braços fechados do LCE.....	46
Figura 15 - Gráficos demonstrando a permanência no braço aberto do LCE.....	47
Figura 16 - Gráficos demonstrando as médias do tempo de exploração dos objetos A1, A2, A3 e B.....	48
Figura 17 - Gráficos demonstrando as médias das taxas de discriminação.....	49
Figura 18 - Gráficos demonstrando a locomoção total e o número de vezes que os animais ficaram em pé.....	50
Figura 19 - Gráficos demonstrando a permanência dos animais nos quadrantes adjacentes do aparato e o efeito anti-tigmotático.....	51
Figura 20 - Gráficos comparativos da estimativa do número de perfis neurais no núcleo estriado e pálido.....	52

Figura 21 - Gráfico comparativo da estimativa do número de perfis neurais no núcleo pálido.....	53
Figura 22 - Fotografias comparando camundongos machos dos diferentes grupos estudados.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMA** - Agência Mundial Antidoping
- BDNF** – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- COI** – Comitê Olímpico Internacional
- DF** – Doença de Fahr
- DHT** – Diidrotestosterona
- DIC** – Delineamento Inteiramente Casualizado
- DN** – Decanoato de Nandrolona
- EAA** – Esteróides Anabólicos Androgênico
- EG** – Exploração Global
- EGT** – Exploração Global Teste
- GABA** – Ácido Gama-Amino-Butírico
- H** – Habituação
- IP** – Intraperitonal
- LCE** – Labirinto em Cruz Elevado
- Ne** – Núcleo Estriado
- NMDA** – N-Metil-D-Aspartato
- Np** – Núcleo Pálido
- R** – Reconhecimento ou Discriminação
- RNA_m** – RNA mensageiro
- SNC** – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	OS ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS	19
2.2	CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DOS EAA	20
2.3	O USO ABUSIVO DOS EAA	23
2.4	MECANISMOS MOLECULARES DOS EAA	26
2.5	MEMÓRIA	27
2.6	ANSIEDADE	29
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
5	MATERIAL E MÉTODO	32
5.1	ANIMAIS.....	32
5.2	TRATAMENTO	32
5.3	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
5.3.1	Análise de Ansiedade – Labirinto em Cruz.....	34
5.3.2	Análise de Memória e Reconhecimento de Objetos	35
5.3.3	Atividade Motora Espontânea no Campo Aberto	37
5.4	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	38
5.5	PROCESSAMENTO E COLORAÇÃO.....	39
5.6	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS.....	40
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
6	RESULTADOS	43
6.1	TESTE DE ANSIEDADE	43
6.1.1	Resultados da Taxa de Entrada nos Braços Abertos	43
6.1.2	Resultados da Taxa de Entrada nos Braços Fechados	44
6.1.3	Resultados do Tempo de Permanência nos Braços Fechados	45
6.1.4	Resultados do Tempo de Permanência nos Braços Abertos	46
6.2	TESTE DE MEMÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	47
6.3	ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA NO CAMPO ABERTO	49

6.4	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS	51
7	DISCUSSÃO	54
7.1	TESTE DE ANSIEDADE	54
7.2	TESTE DE MEMÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS	56
7.3	CAMPO ABERTO	57
7.4	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE PERFIS CELULARES DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS	58
8	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

Os Esteroides Anabolizantes ou Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA) são substâncias sintetizadas à base do hormônio testosterona. Hormônio é uma substância química secretada, em pequenas quantidades, na circulação sanguínea e que, transportada até os tecidos-alvos, produz uma resposta fisiológica. Quimicamente, os hormônios são classificados como amins, proteínas, peptídeos ou esteroides (CUNHA et al., 2004).

A testosterona, conhecida como hormônio androgênio, provoca o crescimento e o desenvolvimento das gônadas masculinas na espécie humana. Como tal, promove o desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas como: crescimento dos pelos púbicos, axilares e de barba; crescimento da faringe; espessamento das cordas vocais; além de maior ativação das glândulas sebáceas e espessamento da pele (CUNHA et al., 2004). Segundo Machado et. al. (2002), ela também promove o efeito anabólico, que está relacionado ao crescimento de massa muscular, através da hipertrofia de fibras musculares, devido ao aumento de síntese proteica intracelular. Os anabolizantes foram criados com o intuito de potencializar esse efeito da testosterona, promovendo aumento da força de contratilidade e do volume da célula muscular, através, também, do incremento da armazenagem de fosfocreatina, balanço nitrogenado positivo, aumento da retenção de glicogênio, favorecimento da captação de aminoácidos e bloqueio do hormônio cortisol.

Nas últimas décadas essas drogas vêm sendo utilizadas por atletas de elite, em maior parte, aqueles envolvidos em esportes de força e velocidade, para melhora do desempenho físico nas competições. Entretanto, o abuso dos EAA passou a ser feito por frequentadores de academias, mais interessados nas alterações provocadas na composição corporal, observados com o aumento da massa magra e na redução da gordura subcutânea (VENÂNCIO et al., 2010).

O telencéfalo compreende os dois hemisférios cerebrais, direito e esquerdo, os quais são incompletamente separados pela *fissura longitudinal do cérebro*. O principal meio de união entre os dois hemisférios é formado por um grande feixe de fibras comissurais, o *corpo caloso* (MACHADO, 2014). O telencéfalo é composto por uma parte mais cortical, o *córtex*, e abaixo deste ainda existem as áreas subcorticais onde estão localizados os núcleos da base.

Tradicionalmente os núcleos da base são: *claustrum*, *corpo amigdalóide*, *núcleo caudado*, *putâmen* e *globo pálido*. O Corpo Estriado é constituído pelo núcleo caudado, putâmen e globo pálido. Esses dois últimos núcleos constituem o *núcleo lentiforme*. Mais

recentemente, podemos dividir o corpo estriado em uma parte mais nova, *neostriado* ou *striatum*, que compreende o putâmen e o núcleo caudado; e uma parte antiga, *paleostriado* ou *pallidum*, constituída pelo globo pálido (MACHADO, 2014).

O termo *corpo estriado* se refere ao aspecto em secções coradas para mielina, onde vários feixes de fibras mielinizadas atravessam as massas celulares e lhes conferem um aspecto estriado. Já o *corpo pálido* recebe este nome pela sua cor pálida quando comparado com o putâmen e o núcleo caudado (BRODAL, 1984).

Machado (2014), afirma que ao contrário dos outros componentes do sistema motor, o corpo estriado não tem conexões aferentes ou eferentes diretas com a medula suas funções são exercidas por circuitos nos quais áreas corticais de funções diferentes projetam-se para áreas específicas do corpo estriado que, por sua vez, liga-se ao tálamo e, através deste, às áreas corticais de origem. Fecham-se, assim, os circuitos em alça corticoestriado-talamocorticais, dos quais já foram identificados cinco tipos, a saber:

- a) *Circuito motor* - começa na área motora e somestésica do córtex e participa da regulação da motricidade voluntária;
- b) *circuito oculomotor* – começa e termina no campo ocular motor e está relacionado aos movimentos oculares;
- c) *circuito pré-frontal dorsolateral* – começa na parte dorsolateral da área pré-frontal. Projeta-se para o núcleo caudado, daí para o globo pálido, núcleo dorsomedial do tálamo e volta ao córtex pré-frontal. Suas funções são aquelas atribuídas a esta porção da área pré-frontal;
- d) *circuito pré-frontal orbitofrontal* – começa e termina na parte orbitofrontal da área pré-frontal e tem o mesmo trajeto do circuito pré-frontal dorsolateral. Tem as mesmas funções da área pré-frontal orbitofrontal, ou seja, manutenção da atenção e suspensão de comportamentos socialmente indesejáveis.
- e) *circuito límbico* – origina-se nas áreas neocorticais do sistema límbico, em especial a parte anterior do giro do cíngulo, projeta-se para o estriado ventral em especial o núcleo accumbens, daí para o núcleo anterior do tálamo. Este circuito está relacionado com o processamento das emoções.

Os neurônios do complexo estriado são, em sua maioria, denominados neurônios ou células espinhosas médias, devido ao seu tamanho moderado e ao grande número de espinhas ou espículas dendríticas que, em geral, alcançam apenas a região onde se localiza o corpo celular. Seus axônios formam as únicas fibras eferentes do neostriado e têm como principal neurotransmissor inibidor o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA), mas podem conter outros

(também inibidores), em especial neuropeptídeos, como a substância P e a encefalina. Os neurônios do paleostriado ou pallidum (núcleo pálido) são essencialmente GABAérgicos (inibidores) e disparam espontaneamente, inibindo tonicamente (continuamente) as suas células-alvo. Os neurônios do núcleo Basal de Meynert são grandes e colinérgicos. Na Doença de Alzheimer há grande perda desses neurônios, bem como de neurônios colinérgicos de outras áreas, como córtex cerebral, hipocampo e área septal. As duas partes do globo pálido estão reciprocamente conectadas (fibras pálido-palidais), mas se prestam a diferentes funções. As principais aferências ao paleostriado são axônios das células espinhosas médias do neostriado (fibras estriado-palidais) de dois tipos: os que se projetam ao pálido-interno (e também à substância negra) e contêm os neurotransmissores GABA e substância P e os que chegam ao pálido-externo e contêm GABA e encefalina (HAINES, 1997).

Teixeira e Cardoso (2004) afirmam que os núcleos da base são classicamente associados a funções motoras, sendo referidos como sistema extrapiramidal. Nos últimos anos, pesquisas sugerem que eles participem de outras dimensões do comportamento humano, tendo sido descritos cinco circuitos paralelos envolvendo os núcleos da base e do córtex frontal. Cada um deles controla distintos tipos de comportamentos, abrangendo desde movimentos a ações cognitivas e emocionais. Esses circuitos frontoestriatais facilitam comportamentos determinados pelo córtex cerebral, inibindo comportamentos conflitantes. Os substratos neurobiológicos de uma série de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo transtornos do espectro obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, depressão e dependência de drogas, implicam o envolvimento desses circuitos frontoestriatais.

As calcificações intracranianas são relativamente comuns e podem ser fisiológicas ou associadas a várias doenças do sistema nervoso central (SNC) como infecções, anomalias congênitas, distúrbios metabólicos, ou processos tumorais, entre outras. Os núcleos da base podem apresentar calcificações e, na maioria dos casos, a calcificação é pequena, bilateral, usualmente restrita aos globos pálidos, mas pode envolver o putâmen, núcleo caudado, tálamo, núcleos denteados do cerebelo e substância branca dos hemisférios cerebrais (TEDRUS et al., 2006).

Kümmer et al., (2006) relata que a Doença de Fahr (DF) é paradigmática para os estudos que relacionam os núcleos da base não apenas à motricidade, mas a diferentes aspectos do comportamento humano. Isso porque a DF acomete preferencialmente o globo pálido, embora seja frequente a calcificação em outras regiões, como em pacientes já relatados. As estruturas dos núcleos da base, ao constituírem os circuitos frontal-subcorticais, também denominados frontoestriatais, facilitariam determinados comportamentos em

detrimento de outros comportamentos conflitantes. Não é surpreendente, portanto, que alterações comportamentais reflitam interrupção desses circuitos.

Os núcleos da Base tem função

Após conhecer a estrutura e a função dos núcleos da base, a relação desta estrutura com os esteroides anabolizantes, o crescente uso indevido de substâncias anabolizantes, além da escassez de estudos para elucidar os efeitos deletérios do uso de tais substâncias, quando utilizadas sem o devido acompanhamento médico, achamos por bem estudar quais os efeitos de tais substâncias nos corpos celulares de neurônios e no comportamento dos animais usados neste experimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Na Medicina, os EAA são utilizados geralmente no tratamento de sarcopenias, hipogonadismo, câncer de mama e da osteoporose. Nos esportes, são utilizados para o aumento da força física e da massa muscular; entretanto, os efeitos sobre o desempenho atlético permanecem, ainda, controversos (SILVA et al., 2002).

Propõe-se que o aumento do desempenho esportivo com o uso dos EAA se deva a vários mecanismos diferentes: estimulação direta da síntese de proteína muscular, antagonismo do efeito catabolizante dos glicocorticóides, aumento da eritropoiese, estimulação do SNC e efeito placebo. Entretanto, nenhum deles está comprovado. Enquanto os dois primeiros explicariam o aumento de volume muscular nos usuários, ainda não foi constatada a melhora da capacidade aeróbica que se esperaria pelo aumento de eritropoiese. Já os dois últimos, estimulação do SNC e efeito placebo, seriam os responsáveis pela sensação subjetiva de aumento de energia e resistência física relatada pelos usuários (PELUSO et al., 2000).

Estudos realizados no National Institute on Drug Abuse têm descrito que a forma com que os EAA são utilizados por atletas obedecem, basicamente, a três metodologias: a primeira, conhecida como “ciclo”, refere-se a qualquer período de utilização de tempos em tempos, que varia de 4 à 18 semanas; a segunda, denominada “pirâmide”, começa com pequenas doses, aumentando-se progressivamente até o ápice e, após atingir esta dosagem máxima, existe a redução regressiva até o final do período; e a terceira, conhecida como “stacking” (uso alternado de esteroides de acordo com a toxicidade), refere-se à utilização de vários esteroides ao mesmo tempo. Há também entre os atletas o hábito comum de utilizar a mistura dos três métodos descritos acima. Os EAA são administrados, geralmente, em doses supra-fisiológicas que poderão chegar a até 500mg por dia, consumidos por várias semanas ou meses (SILVA et al., 2002).

O uso de EAAs no meio esportivo atravessou décadas, fazendo parte da política esportiva oficial de alguns países. Porém os estudos sobre a participação desse tipo de substância sobre a *performance* dos atletas demoraram algum tempo a ser comprovados. Pois

esses estudos não observavam alterações na potência, na força e na secção transversa muscular, isso porque as dosagens dos EAAs administradas nas cobaias eram bem abaixo das usadas pelos atletas (MELLO et al., 2005).

Em 1972, nas Olimpíadas de Munique, 68% dos atletas corredores de curta e média distância admitiram fazer uso de EAA (LOUGHTON; RUHLING, 1977). Desde 1975, pouco antes das Olimpíadas de Montreal, o uso de EAA foi proibido pelas autoridades esportivas como o Comitê Olímpico Internacional (COI), e o seu controle é realizado por análises bioquímicas principalmente em amostras de urina, tanto fora quanto em época de competição (KOCHAKIAN; YESALIS, 2000). Porém, mesmo com o controle do COI para o uso de substâncias proibidas, as quatro olimpíadas que ocorreram entre os anos de 1984 (Los Angeles) e 1996 (Atlanta) foram marcadas pelo alto índice de casos positivos para doping.

A partir das Olimpíadas de 2000 (Sydney) deu-se início a coleta de sangue para realização de exame antidoping em esportes aeróbios. Nas Olimpíadas de Atenas (2004), seguiu-se pela primeira vez, como parâmetro para o teste de doping, a lista de substâncias e métodos proibidos editada pela Agência Mundial Antidoping (AMA) (WADA, 2010).

2.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Ballard e Wood (2005) afirmam que modificações da molécula de testosterona incluem a hidroxilação na posição C-10 para aumentar a potência relativa como por exemplo, nandrolona; esterificação para diminuir a taxa de inserção em circulação, por exemplo, cipionato de testosterona (PAVLATOS et al., 2001), ou alquilação na posição C-17 para reduzir a primeira passagem do metabolismo no fígado, permitindo assim a administração oral, por exemplo, estanozolol (GALLAWAY, 1997; YESALIS, 2000; TAYLOR, 2002).

Estas modificações também afetam o metabolismo de estrogênio ou o mais potente andrógeno, diidrotestosterona (DHT). Andrógenos não aromatizáveis por exemplo, dianabol drostanolone produzem menos efeitos colaterais, tais como ginecomastia (YESALIS, 2000). Andrógenos irredutíveis (por exemplo, oxandrolona, oximetolona) pode ter uma melhor relação anabólico-androgênico (SHAHIDI, 2001).

Os EAA são estruturas de quatro anéis com 19 átomos de carbono. Existem três principais classes de EAA conforme a Figuras 1 e 2 (CLARK; HENDERSON, 2003):

A primeira classe é representada por compostos injetáveis, ésteres do grupo 17- β -hidroxil (propionato e cipionato de testosterona) (Figura 1). A esterificação retarda a degradação do composto e prolonga o tempo de ação devido à liberação sistêmica mais lenta (SHAHIDI, 2001). Os ésteres de testosterona podem ser hidrolizados a testosterona livre; reduzidos a 5 α -diidrotestosterona, um metabólito com maior atividade biológica, devido a sua maior afinidade pelos receptores andrógenos do que a testosterona, essa pode ser aromatizada a estrógenos pela ação da enzima aromatase (MARTINI, 1982; KOCHAKIAN, 1993).

A segunda classe refere-se a compostos injetáveis que abrangem os derivados da 19-nortestosterona. Estes compostos derivam dos ésteres de testosterona através da adição de uma cadeia carbonada longa no C17. Também sofrem a substituição de um hidrogênio por uma metila no C19. O tipo de ácido usado para acidificar este grupo original determina a duração da ação anabólica. A substituição de um hidrogênio por um grupo metil resulta na formação de 19-nortestosterona (nandrolona) e a esterificação do grupo 17-hidroxil da nandrolona com ácido decanóico, um ácido graxo de cadeia longa, forma o decanoato de nandrolona (DN) (Figura 1). A desmetilação do C19 aumenta a meia-vida desta classe de compostos e contribui para sua esterificação o qual é liberado na circulação vagarosamente e exerce sua atividade anabólica dentre 6 a 7 dias (RYAN, 1959; BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001; SHAHIDI, 2001).

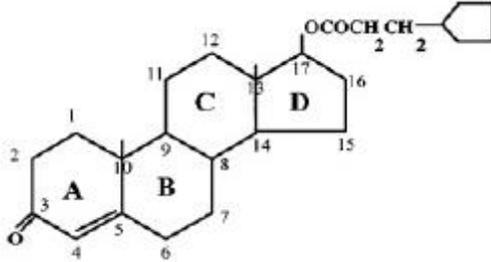
Os EAA aromatizáveis, tanto da 1^a classe, quanto da 2^a classe, possuem efeitos significativos no SNC não somente pela interação farmacológica direta com os receptores andrógenos, mas também através de metabólitos ativos (estrógenos) que se ligam a receptores estrogênicos cerebrais (WILSON, 1988).

A terceira classe refere-se aos compostos alquilados no C17 incluindo a metiltestosterona, oximetolona, metandrostenilona e stanozolol (Figura 2). O processo de alquilação, no qual a molécula de testosterona é modificada e comumente um grupo metil (CH₃) ou etil (C₂H₅) é introduzido na posição C17, dificulta a metabolização hepática, possibilitando a este grupo de EAA ser administrado por via oral. Não há conversão de esteroides 17 α -alquilados a DHT ou 17 β -estradiol, porém outros metabólitos andrógenos e estrógenos ativos podem ser formados. Esse processo preserva as propriedades ativas dos esteroides, porém traz uma grande sobrecarga ao fígado. (SHAHIDI, 2001; BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001).

Figura 1- Estruturas químicas dos representantes das três principais classes de EAA

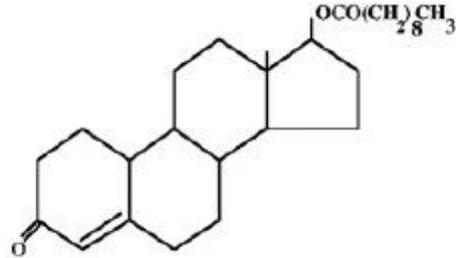
I. Ésteres de Testosterona

Cipionato de Testosterona



II. 19-Nor-testosterona

Decanoato de Nandrolona



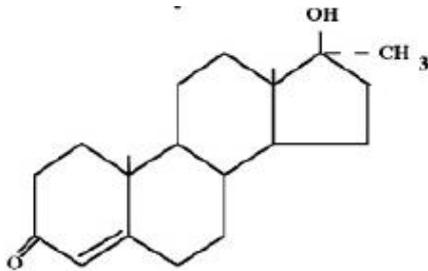
Notas: I- derivados de ésteres de testosterona; II- derivados da 19-Nor-testosterona.

Fonte: Figura adaptada de Clark e Hederson (2003).

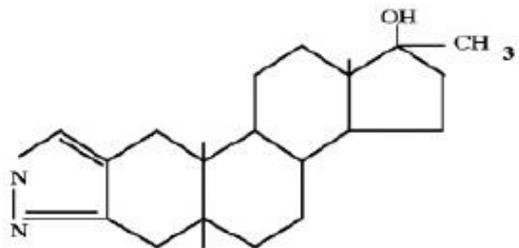
Figura 2- Estruturas químicas dos representantes das três principais classes de EAA

III. 17 α -Alquilados

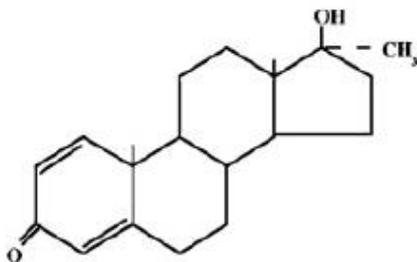
17 α -Metiltestosterona



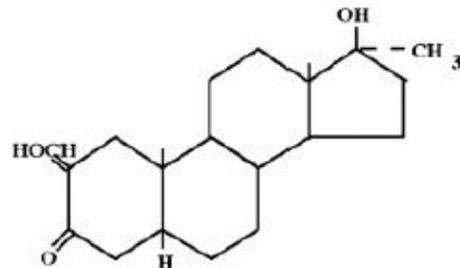
Stanozolol



Metandrostelona



Oximetolona



Notas: III- compostos alquilados no C17.

Fonte: Figura adaptada de Clark e Hederson (2003).

2.3 O USO ABUSIVO DOS EAA

Mello et al. (2005) encontrou em seus estudos que o uso abusivo dos EAA pode acarretar o aparecimento de efeitos colaterais reversíveis e irreversíveis, na maioria dos sistemas do organismo (fígado, sistema cardiovascular e endócrino). Dentre esses efeitos podem ocorrer danos no tecido hepático, atrofia de testículos, hipertrofia de clitóris e, em alguns casos, podem chegar à hipertensão arterial e à hipertrofia ventricular esquerda. Outro efeito ocorre sobre a arquitetura do sono. Estes estudos demonstram que o uso de EAAs resulta na diminuição da eficiência do sono e no aumento a latência de sono, trazendo prejuízos à qualidade do sono.

O uso abusivo de EAA é baseado em doses supra fisiológicas que são de 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas, e isso tem sido associado a um amplo espectro de efeitos adversos físicos e psíquicos. Pouco se sabe sobre a atuação dos EAA no cérebro humano, havendo relatos de alterações no comportamento agressivo, ansiedade e depressão segundo relatos de Pope e Katz (1988), Schulte et al. (1993) e Ambar (2008).

O sistema reprodutor sofre diversas alterações com o uso de EAA. Em homens, o uso indiscriminado destas substâncias diminui os níveis dos hormônios luteinizantes e folículo estimulante, os quais levam a diminuição da produção de testosterona endógena, da espermatogênese e atrofia testicular, podendo até causar infertilidade. A ginecomastia em homens é um efeito muito comum em usuários de anabolizantes e pode resultar da conversão de andrógenos para estradiol e estrona (WAGNER, 1991; MARAVELIAS et al., 2005). Porém em um estudo de Takahashi, Tatsugi e Kohno (2004) com ratos, a administração de EAA provocou uma significativa elevação na testosterona, dihidrotestosterona e 17 α -estradiol, o que leva o autor a acreditar que as diferenças de resultado ocorrem devido a diferenças no sistema metabólico de EAA entre ratos e humanos.

Observou-se que os efeitos dos EAA sobre o comportamento agressivo são extremamente dependentes do tipo de composto utilizado, regime de uso, dose e meio de administração, assim como variando entre espécies e linhagens e o paradigma utilizado na experimentação (GRIMMES et al., 2006).

Agis-Balboa et al. (2009) estudou os efeitos da propionato de testosterona (testosterona) em usuários de tal substância e mostrou que este esteróide anabolizante induz medo excessivo.

A associação dos efeitos psicológicos a altas doses e ao uso contínuo de esteroides causa efeitos imediatos no comportamento como motivação, euforia, entusiasmo, diminuição da sensibilidade, fadiga, aumento da sensibilidade a dor, e aumentando o tempo de uso surge à perda da inibição, mudança no humor, irritabilidade, surgindo também o comportamento anti-social ou violento com ataques de fúria (BROWER et al., 1990; CORRIGAN, 1996)

Middleman et al. (1995), apontam os EAA como importantes agentes causadores da síndrome comportamental de risco nos adolescentes. Encontrou-se também, em outro estudo, o uso de EAA ligado a atos agressivos (brigas e agressões) e a crimes contra a propriedade. Dentre os efeitos negativos do abuso de EAA estão irritabilidade, raiva e hostilidade, e sintomas cognitivos como distração, esquecimento e confusão.

Corrigan (1996) divide os efeitos psicológicos em três grupos, arbitrariamente, representando os efeitos continuados provocados por essas drogas:

- 1) Nos efeitos imediatos são vistas a mudança de humor e a euforia: existe melhora da confiança, energia e autoestima, com aumento da motivação e do entusiasmo. Há diminuição da fadiga, insônia e habilidade para treinar com dor, irritação, raiva, agitação.
- 2) Os EAA, depois de administrados em altas doses por longo período, promovem a perda da inibição, com alterações de humor.
- 3) Os efeitos graves manifestam-se quando esses sentimentos de agressividade evoluem para comportamentos violentos, hostis e anti-sociais. Os ataques de fúria vão desde o abuso infantil até os suicídios e assassinatos.

Recentes modelos animais demonstraram que o uso crônico e o abuso de EAA (stanozolol) reduzem os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro e dopamina no hipocampo e córtex pré-frontal. Além da redução na expressão dos receptores de glucocorticóides no hipocampo e no plasma e aumento dos níveis basais matinais de cortisol plasmático. Estas alterações metabólicas têm sido relacionadas a distúrbios do humor, como a depressão (TALIH et al, 2007; TUCCI et al, 2012).

Segundo um trabalho recente de Büttner et al. (2001), um jogador de basquete de 33 anos de idade, veio a falecer devido à um infarto do miocárdio. Em um exame neuropatológico foi encontrado uma calcificação bilateral simétrica, conhecida como Doença de Fahr, envolvendo os núcleos da base. A causa da DF foi correlacionada com o uso de EAA durante muitos anos por esse jogador. A DF, epônimo para calcinose estriado-pálido-denteada idiopática, refere-se à calcificação idiopática bilateral nos núcleos da base, esporádica ou familiar, supostamente uma doença autossômica dominante. Alguns autores empregam o termo síndrome de Fahr para descrever a calcificação patológica nos núcleos da base que

pode ser causada por doenças de etiologias diversas. Essas calcificações são usualmente benignas, sem etiologia definida e com localização preferencial nos globos pálidos, especialmente em pacientes acima de 60 anos de idade (KÜMMER et al., 2006).

Sabe-se muito pouco sobre os efeitos dos EAA na ansiedade. O primeiro estudo destes efeitos foi realizado por Bitran et al. (1993) o qual demonstrou que altas doses de propionato de testosterona alteram o comportamento de ratos Long–Evans no aparato de Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Neste estudo, os animais foram testados em 6 e 14 dias de tratamento com a substância. Com 6 dias de tratamento, os animais aumentaram a exploração nos braços abertos, isto é, teve um efeito ansiolítico. Porém com 14 dias de tratamento, os animais tratados não foram diferentes do grupo controle. Estes resultados indicam um caráter ansiolítico transitório do tratamento com o propionato de testosterona.

Rocha (2006) também avaliou, mais recentemente, o efeito do DN sobre o nível de ansiedade de ratos de 2 meses de idade que foram aleatoriamente divididos em 6 grupos (n = 12- 15/grupo): controle, veículo, nandrolona, controle + diazepam, veículo + diazepam e nandrolona + diazepam. Animais tratados com veículo receberam administração de propilenoglicol (0,2 ml/ Kg inta-muscular.) ou DN (5mg/Kg intra-muscular), respectivamente, 2 vezes por semana, durante 6 semanas concluindo que a nandrolona não promoveu alteração no número de entradas nos braços fechados, na avaliação de risco e no número de idas ao final dos braços abertos. O tratamento com diazepam reverteu os efeitos causados pela nandrolona na porcentagem de tempo e no número de entradas nos braços abertos. Estes dados sugerem que o DN induziu aumento no nível de ansiedade em ratos de laboratório.

De uma maneira geral os poucos estudos que abordaram EAA e ansiedade apresentam resultados controversos. Mais especificamente, o tratamento com DN em ratos apresentou tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos (BITRAN et al., 1993; CLARK; HENDERSON, 2003).

Corrigan (1996), afirma que além de casos de suicídio, outras alterações psiquiátricas associadas ao uso de EAA ocorrem em atletas. Dentre elas podemos citar casos de esquizofrenia aguda vinculados ao uso do esteróide metandienona; a mania, hipomania e a confusão mental, além de paranóia e depressão, em razão do uso de oxandrolona e oximetolona.

Entre os estudos clínicos que pesquisaram as propriedades antidepressivas de EAA existe um que relata o desenvolvimento de delírios paranóides em 4 de 5 homens, quando metiltestosterona foi acrescentada ao tratamento com imipramina (WILSON et al., 1974). Por outro lado, estudos sobre o uso de EAA no tratamento de anemias, distrofia muscular e

hipogonadismo, raramente notaram efeitos psiquiátricos importantes. Entretanto, todos esses estudos utilizaram doses bem menores que as utilizadas por atletas (PELUSO et al., 2000).

Orlando et al. (2007) comparou o efeito da testosterona com os EAAs 19-nortestosterona (nandrolona), estanozolol e gestrinona, sobre a morte neuronal excitotóxica induzido por N -metil-D -aspartato (NMDA) em culturas primárias de células do córtex do rato. Nas experiências de maior relevância, os esteroides foram aplicados às culturas uma vez ao dia durante os 4 dias que precedem a adição de NMDA. Sob estas condições, a testosterona amplificou a morte neuronal excitotóxica apenas em concentrações muito elevadas (10 uM), ao passo que era de proteção às concentrações de 10 nM e inativa em concentrações intermédias. Baixas concentrações de testosterona se tornaram neurotóxicas na presença dos inibidores da aromatase, isto é, anastrozol e aminoglutetimida, sugerindo que a toxicidade intrínseca da testosterona foi contrabalanceada pela sua conversão em 17β -estradiol. Ao contrário da testosterona, os EAA nortestosterona, stanozolol e gestrinona, amplificados pela toxicidade NMDA em concentrações nanomolares, tiveram sua ação insensível aos inibidores da aromatase, mas foi revogada pelo antagonista do receptor de andrógeno, flutamida. Nenhum dos EAA eram tóxicos na ausência de NMDA. Estes dados sugerem que o aumento da vulnerabilidade neuronal aos EAA somado a um impulso excitotóxico podem, portanto, facilitar a morte neuronal associada com desordens agudas ou crônicas do sistema nervoso central.

2.4 MECANISMOS MOLECULARES DOS EAA

Com relação aos mecanismos celulares e moleculares dos hormônios esteroides, vale lembrar que os efeitos obtidos em curto prazo parecem ser devido a modulações alostéricas ou ações pós-tradicionais na membrana celular. Entretanto, os efeitos que só são evidentes após a administração prolongada dos EAA implicam em alterações na expressão gênica, mediadas pela ação de receptores androgênicos e estrogênicos no cérebro. Os hormônios esteroides atuam em proteínas receptoras intracelulares, e após a ligação do hormônio ao receptor ocorre uma translocação desse complexo para o núcleo celular e então para sítios de ligação na cromatina, através dos quais modulam a transcrição gênica e subsequente síntese de RNA mensageiro (RNAm). Efeitos diferenciais são observados dependendo do local e tipo celular em que estão atuando (AMBAR, 2008).

Ambar (2008) estudou camundongos tratados com DN cronicamente e estes apresentaram diminuição na quantidade de RNAm do receptor dopaminérgico D1 nos núcleos caudado-putâmem e núcleo *acumbens*, receptor também implicado à modulação do comportamento agressivo. Outros estudos feitos por Thiblin et al. (1999), Hallberg et al. (2000) e Yang (2002), correlacionaram as alterações comportamentais aos efeitos dos EAA nas neurotransmissões centrais serotoninérgicas, gabaérgicas, entre outras, em diversas áreas do cérebro.

Estudos recentes (MCINTYRE et al., 2002 e CLARK et al., 2006) estão começando a investigar mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de EAA em roedores. O uso crônico de EAA em camundongos mostrou-se indutor de mudanças no nível de fator neurotrófico derivados do cérebro, dependentes de dose, sexo e idade na expressão gênica da subunidade do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico.

O envolvimento glutamatérgico foi recentemente demonstrado por Fischer et al. (2007), em hamsters adolescentes tratados com EAA pelo aumento nos neurônios que expressam glutamato e na expressão do receptor GluR1 em áreas específicas de agressividade (AMBAR, 2008).

2.6 MEMÓRIA

A formação da memória tem início com a aquisição de informações recebidas através de estímulos sensoriais, sendo devidamente processadas posteriormente. Esse sistema inicial de processamento decorre de múltiplos subcomponentes (visual-espacial, fonológico, centro executivo) que receberão as informações das diferentes vias sensoriais, para serem processadas em curto período de tempo (BADDELEY, 1998). Esse processo “temporário”, conhecido como memória operacional ou de trabalho, ocorre no córtex pré-frontal e parte do giro do cíngulo e é responsável por um armazenamento transitório da informação, como compreensão de linguagem, aprendizado e raciocínio (ATKINSON; SHIFFRIN, 1986; BADDELEY, 1992).

Para que essa informação “transitória” se torne mais estável e, conseqüentemente, mantenha-se por maior tempo “armazenada”, é necessário que ocorra um processo de consolidação da memória, que pode ser de uma memória de curto prazo (minutos ou algumas

horas) ou uma memória de longo prazo (muitas horas, dias ou anos), sendo que a memória de curto prazo não é pré-requisito para a formação daquela de longo prazo (SQUIRE, 1992; IZQUIERDO et al., 1998).

Essa forma mais estável da memória é decorrente de plasticidade, fenômeno no qual ocorre o prolongamento neuronal e a formação de novas conexões sinápticas. A plasticidade de curto prazo envolveria somente alterações covalentes de proteínas pré-existentes, ao passo que a plasticidade de longo prazo requer alterações na expressão gênica e síntese de novas proteínas, para o estabelecimento de novas conexões (FREY et al, 1993; BAILEY et al, 1999; SCHAFE et al, 2001).

As memórias também podem ser classificadas em memórias declarativa (ou explícita) e não declarativa (ou implícita).

A memória declarativa é aquela que é chamada de memória propriamente dita. É a memória de fatos, eventos, seqüência de eventos, idéias, que podem ser relatados, que são acessíveis conscientemente. Essa memória depende da região do lobo temporal, principalmente do hipocampo, que tem muitas fibras de conexão com o córtex pré-frontal, entorrinal e parietal (WITTER et al, 1989; ZOLA-MORGAN; SQUIRE, 1990; SQUIRE, 1992; RIEDEL; MICHEAU, 2001).

Já a memória implícita, conhecida como memória de hábitos, é uma memória sujeita a responder a estímulos através da prática. Esse processo inclui a capacidade para detectar ou identificar objetos como resultado de contatos anteriores recentes, um fenômeno conhecido como *priming*. No caso da memória implícita, o desempenho vai alterando-se em função da experiência, justificando o termo memória, no entanto, não ocorre um acesso consciente ao episódio (SQUIRE et al, 1993). As memórias implícitas incluem tarefas de habilidades motoras (andar de bicicleta) e de percepção (esquivar-se de um choque elétrico ao ouvir um som sinalizador), estudadas em testes de condicionamento clássico, operante e memórias associativas.

Em estudos para verificar a participação das estruturas cerebrais no armazenamento da memória implícita, em humanos e animais, demonstrou-se que alguns hábitos aprendidos perduram mesmo quando são ocasionados danos no hipocampo, mas ocorrem prejuízos significativos quando o dano ocorre no caudado putamen (PACKARD et al, 1989; KNOWLTON et al, 1996).

2.7 ANSIEDADE

Quando um animal é confrontado com uma ameaça ao seu bem-estar, à sua integridade física ou à própria sobrevivência, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Tal ameaça pode ser representada por um estímulo material incondicionado, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou por estímulos aprendidos que, por associação repetida com dor ou outras sensações igualmente desagradáveis, adquirem propriedades aversivas condicionadas. Em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, havendo, portanto, um componente de incerteza, teríamos a ansiedade (GRAEFF et al, 1993).

A ansiedade é um fenômeno essencial para uma adaptação biológica normal. Há, entretanto, fatores ambientais e constitucionais envolvidos na sua etiologia, cuja contribuição varia individualmente. A ansiedade pode apresentar-se como traço de ansiedade, próprio da constituição da personalidade de determinados sujeitos. Pode, também, apresentar-se como estado de ansiedade, que ocorre como uma manifestação de uma reação psicogênica ao estresse, de menor duração (EDWARDS, 1991). Clinicamente, tem-se reconhecido que ansiedade não é um fenômeno unitário, e tem sido postulada a existência de diferentes tipos de ansiedade patológica, como o pânico, fobias e estresse pós-traumático (GRAEFF et al, 1998).

Diante desses fatos e considerando o desconhecimento dos mecanismos neurais envolvidos na vasta gama de efeitos comportamentais e emocionais que acompanham o uso dos EAA, se torna necessária a realização de novas pesquisas na busca pela elucidação dos mecanismos cerebrais a eles subjacentes.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento do uso indevido de substâncias anabolizantes, e à escassez de estudos para elucidar os efeitos deletérios do uso de tais substâncias, quando utilizadas sem o devido acompanhamento médico, achamos por bem estudar quais os efeitos de tais substâncias nos corpos celulares de neurônios e no comportamento dos animais usados neste experimento.

Além das pesquisas que já foram realizadas (ROCHA, 2006; TEDRUS et al., 2006; AMBAR, 2008; AGIS-BALBOA et al., 2009; VENÂNCIO et al., 2010; DAMIÃO et al., 2012), as quais retratam os resultados físicos e psicológicos do uso abusivo de EAA; e outros estudos (TEIXEIRA; CARDOSO, 2004; KÜMMER et. al., 2006; TEDRUS et al., 2006) que relatam lesões nos núcleos da base, ainda se faz necessário muitos outros estudos visando tanto elucidar como também orientar os usuários dessas substâncias, que são principalmente jovens, que buscam, muitas vezes sem a informação necessária, um corpo forte e definido em um tempo recorde, contrariando a natureza do corpo humano.

Além disso, a cada ano, novos anabolizantes são utilizados por esses jovens, que passam a desfrutar dos novos medicamentos, novamente sem nenhuma orientação médica, e principalmente sem a menor instrução de como utilizar tais substâncias.

4 OBJETIVOS

Comparar entre os grupos experimentais o número, por área, dos perfis de corpos celulares de neurônios dos núcleos da base, especificamente núcleo estriado (Ne) e núcleo pálido (Np), além disso analisar o comportamento de camundongos machos e fêmeas tratados com substâncias anabolizantes comparando assim com o grupo controle.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste projeto 60 camundongos da linhagem Swiss, com idade aproximada de 90 dias (jovens-adultos), peso corpóreo entre 40 e 50 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, Unifal- MG, sendo 30 machos e 30 fêmeas, os quais foram alojados em caixas contendo 5 animais cada, tratados com ração comercial e água “ad libitum” e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro.

Esse trabalho está de acordo com os princípios éticos de utilização animal tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unifal-MG, protocolo nº 414/2012, conforme Anexo I.

5.2 TRATAMENTO

O tratamento dos animais foi realizado no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. O tratamento consistiu na aplicação, por via intraperitoneal (IP), de dois EAA: o primeiro, comercializado com o nome de Deposteron® (Cipionato de Testosterona) e o segundo, comercializado pelo nome de Winstrol Depot® (stanozolol), nas doses conforme Quadro 1. Os animais foram tratados durante 1 (um) mês, com aplicações realizadas duas vezes por semana (nas terças e quintas feiras).

As doses utilizadas foram baseadas na quantidade de EAAs utilizada pelos usuários frequentadores de academias (Quadro 1). Porém, a princípio, essa dose foi letal aos animais e, devido a isso, adequamos uma dose que é considerada alta, porém, não letal. Para isso utilizamos o método de Extrapolação Alométrica para chegarmos às doses não letais, porém supra fisiológicas (MAHMOOD, 2007).

Quadro 1 - Grupo de animais de acordo com EAA e a dosagem utilizada.

Grupos	Número de Animais	EAA	Dosagem
Grupo 1	10 machos 10 fêmeas	Deposteron® (Cipionato de Testosterona)	0,8mg/kg /dia
Grupo 2	10 machos 10 fêmeas	Winstrol Depot® (Stanozolol)	1,8mg/kg /dia
Grupo 3	10 machos 10 fêmeas	grupo controle (solução fisiológica)	1,8mg/kg /dia

Os animais, um dia após receberem as doses, isto é, quartas e sextas feiras, foram submetidos à natação por 15 minutos, realizado em um recipiente medindo 43x34x26cm (Figura 3) e contendo no seu interior água, na temperatura de 24-26°C até a borda.

Figura 3- Caixa plástica utilizada para a natação.



Fonte: Do autor.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para análise comportamental utilizamos três testes: análise de ansiedade, memória de reconhecimento de objetos e comportamento em campo aberto.

5.3.1 Análise de Ansiedade – Labirinto em Cruz

O LCE é um método bem conhecido para detectar o efeito de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas, e foi usado como modelo de avaliação de ansiedade nesse estudo.

Pellow et. al. (1985) estudou o LCE e afirma que o uso deste teste para a detecção de tais efeitos de substâncias ansiolíticas e ansiogênicas foi validado comportamental, fisiológica, e farmacologicamente. Os ratos tiveram um número significativamente menor de entradas nos braços abertos do que nos braços fechados. O confinamento para os braços abertos foi associado à observação de comportamentos relacionados com a ansiedade, e de maiores concentrações de plasma de corticosterona. Um aumento significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos foi observado apenas dentro de ansiolíticos clinicamente eficazes (clordiazepóxido, diazepam e, menos eficaz, fenobarbital). Compostos que causam ansiedade no homem reduziu significativamente a porcentagem de entradas e tempo gasto com os braços abertos (ioimbina, pentilenotetrazol, cafeína, anfetaminas).

O teste do LCE consiste em um aparato com dois braços abertos (50 x 10cm cada), dois braços fechados (50 x 10 x 40cm cada) e uma plataforma central (10 x 10cm) formando uma cruz suspensa à 50cm de altura (Figura 4). Os animais foram colocados no fundo de um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Os parâmetros a serem avaliados são:

- 1) Número de entradas com as quatro patas no braço aberto;
- 2) Número de entradas com as quatro patas no braço fechado;

- 3) Tempo de permanência no braço aberto;
- 4) Tempo de permanência no braço fechado.

Figura 4- Aparato do Labirinto em Cruz Elevado



Notas: Utilizado para os testes comportamentais referentes aos parâmetros de ansiedade.

Fonte: Do autor.

5.3.2. Análise de memória e reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi adaptado do modelo descrito anteriormente por Abe et al. (2004). Este teste foi dividido em 3 sessões: familiarização, teste e experimento. A sessão de familiarização foi realizada duas horas antes da próxima etapa, onde foi permitida, a cada camundongo, a exploração do ambiente no qual foram realizados os testes, com o intuito de promover a familiarização do animal com local. O ambiente consiste em uma caixa de madeira (65 x 45 x 45cm) forrada com maravalha (3cm de altura) (Figura 5). A sessão de teste foi a filmagem da exposição de 2 objetos idênticos (A1 e A2) à cada animal, no ambiente descrito acima por 5 minutos. Os objetos foram deixados no canto oposto do local onde o camundongo foi colocado. Foi mensurado o tempo gasto na exploração dos objetos A1 e A2 pelo camundongo através da análise do vídeo. Na fase de experimento, os objetos foram trocados por um terceiro (A3) objeto também idêntico aos 2 anteriores e por um

quarto objeto (B) totalmente diferente, porém de volume semelhante. Os objetos da fase de experimento foram colocados no mesmo lugar dos objetos da fase teste e o camundongo foi exposto aos objetos e filmado por 5 minutos. Foi mensurado o tempo gasto na exploração de cada objeto. A exploração do objeto foi definida como direcionamento do focinho ao objeto (a uma distância de pelo menos 2 cm) e toque do focinho no objeto (ABE et al., 2004).

A exploração global (EG) dos objetos é a soma dos tempos de exploração do primeiro e segundo objetos na sessão de treino:

$$EG = A1+A2$$

A exploração global no teste (EGT) é definida como sendo a soma dos tempos de exploração do terceiro e quarto objeto no teste.

$$EGT = B+A3$$

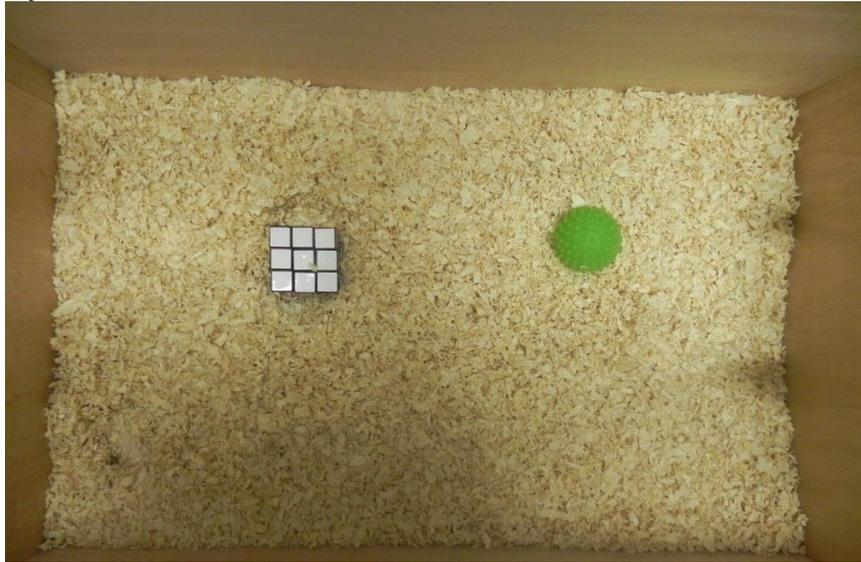
A habituação (H) é aferida pela diferença da exploração entre a sessão de treino e o teste:

$$H = ([A1+A2]-[B+A3])$$

A simples medida de reconhecimento (R) ou discriminação é a diferença entre o tempo gasto na exploração do novo estímulo (B) e o tempo gasto na exploração do estímulo familiar (A3), ou seja, B-A3. Entretanto, para minimizar influência dos níveis totais de exploração, é mais preciso utilizar a diferença no tempo de exploração dividida pelo tempo de exploração total:

$$R = B-A3 / B+A3$$

Figura 5- Aparato utilizado para o teste de memória de reconhecimento de objetos



Nota: A imagem representa a etapa de experimento (segunda etapa).
Fonte: Do autor.

5.3.3 Atividade Motora Espontânea no Campo-Aberto

Este teste possibilita a avaliação da atividade motora, exploratória e da ansiedade do animal (WALSH; CUMMINS, 1976). O Campo aberto consiste de um aparato experimental de acrílico, na forma de uma arena circular de 30 cm de diâmetro (Figura 6), com parede transparente de 30 cm de altura e com o piso dividido em 12 áreas, 8 delas na periferia e 4 no centro. No teste, cada animal é colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise. Sua atividade motora foi avaliada quando o animal atravessava uma linha e colocava as 4 patas dentro de uma mesma área.

Os parâmetros a serem avaliados são:

- 1) Frequência de locomoção, determinada pela contagem de linhas cruzadas dos quadrantes nos quais o animal esteve com as quatro patas;
- 2) Frequência de levantar (rearing), ou seja, o número de vezes em que o animal fica apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tocando ou não as paredes com as patas anteriores;
- 3) Permanência nos quadrantes adjacentes às paredes da arena;
- 4) Efeito anti-tigmotático (razão entre o número de linhas centrais que foram cruzadas sobre o número total de linhas cruzadas).

Os animais do grupo controle foram intercalados aos animais experimentais para cada observação. Após cada teste e antes de colocar um novo animal, o campo aberto foi limpo com álcool 10% a fim de homogeneizar a situação experimental, eliminando possíveis odores deixados pelo animal anterior na arena.

Figura 6- Aparato utilizado para o teste do Campo aberto.



Nota: Utilizado para avaliação da atividade motora espontânea.
Fonte: Do autor

5.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia dos animais com inalação de Alotano® e a identificação de cada animal, iniciamos então, o seguinte procedimento para retirada do encéfalo: Os crânios foram abertos com o auxílio de um alicate de unha e os encéfalos retirados inteiramente. Estes foram então armazenados em recipientes de vidro contendo formaldeído a 4% pH 7,4 0,1M, permaneceram imersos nesta solução fixadora por 24 horas, seguindo o protocolo utilizado por Rabinowiz et al. (2002). Em cada encéfalo foram retiradas amostras homotípicas da

região média do cérebro em cortes frontais (BROWN; AGGLETON, 2001) para que possamos avaliar as áreas então estabelecidas para este estudo (VAN STRIEN et al., 2009) (Figura 7).

Figura 7- Corte frontal de um cérebro de camundongo.



Nota: Corte feito próximo às áreas estabelecidas para o estudo.
Fonte: Departamento de Anatomia (DAnat) da Unifal-MG.

5.5 PROCESSAMENTO E COLORAÇÃO

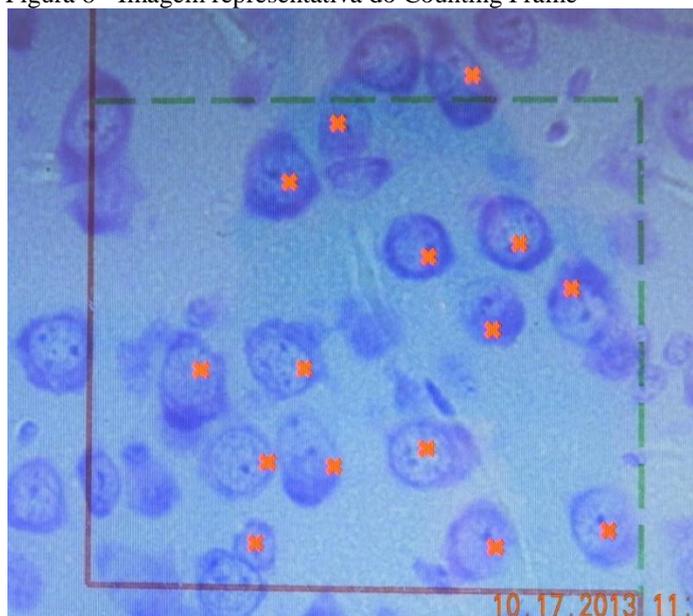
Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cada amostra com as referidas áreas a serem analisadas de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2012), foi emblocada e cortada com espessura de 7 μ m em micrótomo Lupe® e coradas com violeta cresil para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar marcar fortemente e individualmente cada célula para posterior contagem.

5.6 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Para a estimativa da densidade por área dos perfis de corpos celulares de neurônios utilizamos a metodologia de contagem aleatória simples (WEST, 1993a; WEST, 1993b; MANDARIN-DE-LACERDA, 1994; PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1995; MANDARIN-DE-LACERDA, 2003;). Neste método adquirimos 2 campos microscópicos aleatórios de 3 cortes semi seriados da área, totalizando assim seis (6) áreas analisadas por animal. Nestas áreas marcamos somente os perfis dos corpos celulares de neurônios que se encontram dispostos dentro da área teste (counting frame) e na linha de inclusão (linha verde) e excluindo as células nas linhas contínuas em vermelho (Figura 8). Desta forma, aferimos o número de células por área contada, e não o número total dessas células nos Ne e Np (Figuras 9, 10 e 11).

Está análise foi feita com o auxílio de um Sistema Analisador de Imagens Axiovision 4 Module Interactive Mensuerement da marca Carl Zeiss® acoplado a um microscópio Axio Scope A1 da marca Carl Zeiss® e um computador.

Figura 8 - Imagem representativa do Counting Frame



Nota: Área teste desenhado em transparência e fixado no monitor do computador para quantificação de perfis.

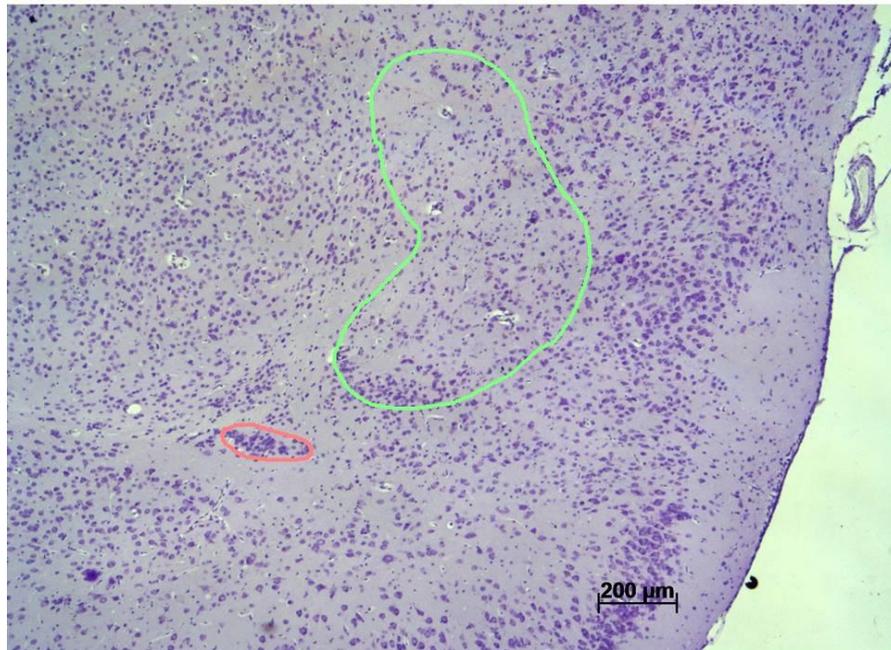
Fonte: Departamento de Anatomia (DAnat) da Unifal-MG.

Figura 9 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo



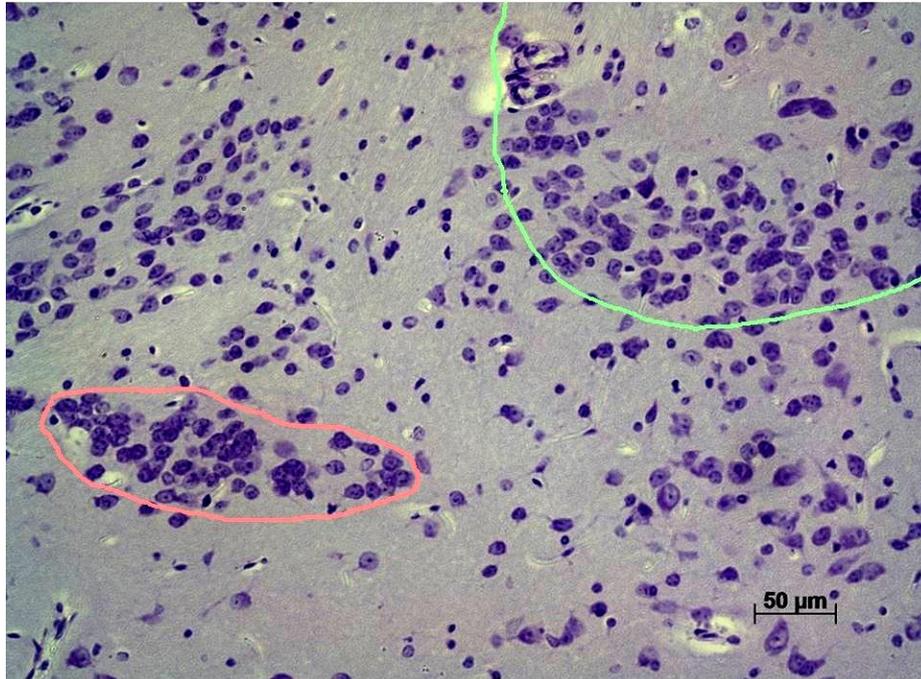
Nota: Núcleo Estriado (rosa) e o Núcleo Pálido (verde); Objetiva de aumento de 5x.
Fonte: Do Autor.

Figura 10 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo



Nota: Núcleo Estriado (rosa) e o Núcleo Pálido (verde); Objetiva de aumento de 10x.
Fonte: Do Autor.

Figura 11 - Fotomicrografia de um corte do encéfalo de camundongo



Nota: Núcleo Estriado (rosa) e o Núcleo Pálido (verde); Objetiva de aumento de 20x.
Fonte: Do Autor.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (One-Way ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

6. RESULTADOS

6.1 TESTE DE ANSIEDADE

A ansiedade faz parte do conjunto de alterações comportamentais, e para avaliar se a administração de EAA seria capaz de induzir tal alteração nos animais tratados, foi utilizado como aparato de pesquisa o LCE, onde os parâmetros avaliados foram a taxa de entrada e taxa de permanência nos braços abertos e fechados. Por caráter didático, para apresentação de todos os parâmetros analisados e resultados obtidos, foi elaborada um quadro (Quadro 2) onde estão expressos os resultados mais significativos de tal análise.

Quadro 2 – Quadro demonstrando os resultados mais relevantes do LCE.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	Sexo	Entrada nos braços abertos	Entrada nos braços fechados	Permanência nos braços fechados	Permanência nos braços abertos
Winstrol®	Macho	↓ *			↓ *
Deposteron®	Macho				
Controle	Macho				
Winstrol®	Fêmea				
Deposteron®	Fêmea			↑ *	↓ *
Controle	Fêmea				

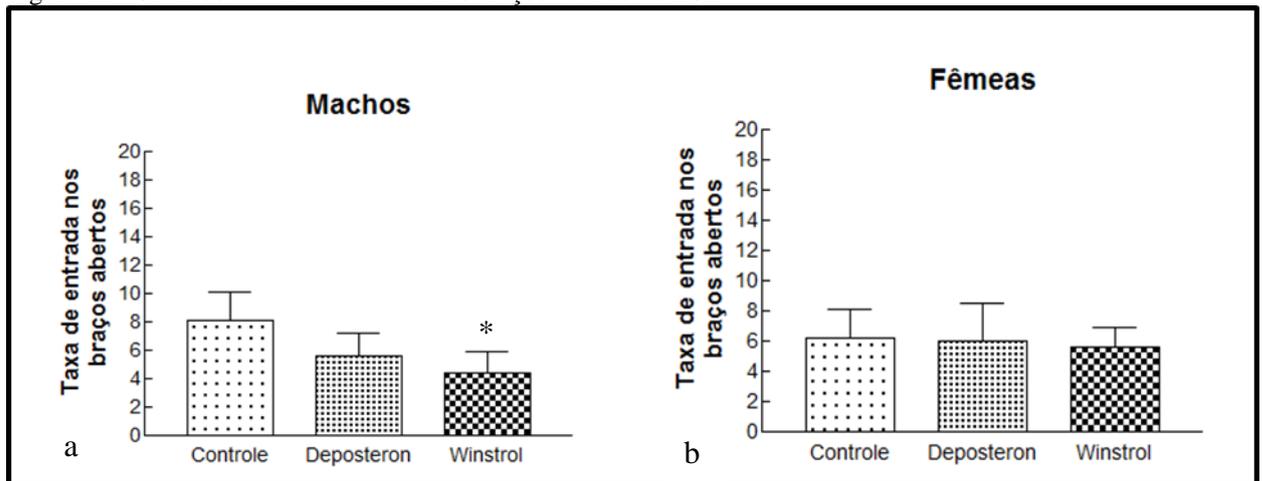
Nota: onde * representa resultados significativos em relação aos outros grupos estudados dentro do mesmo sexo, seta para abaixo (↓) representando diminuição e seta para cima (↑) para aumento do parâmetro analisado.

6.1.1 Resultados da taxa de entrada nos braços abertos

Conforme representação na Figura 12, podemos observar valores estatisticamente significantes na taxa de entrada nos braços abertos entre os grupos macho controle e macho

Winstrol® (12a). A taxa de entrada nos braços abertos dos animais tratados diminuiu, comparados com os animais do grupo controle. Isso nos mostra que os animais tratados encontram-se num quadro aparente de ansiedade. Porém, não foi encontrado nenhum resultado significativo para a taxa de entrada nos braços abertos dos animais fêmeas tratadas (12b).

Figura 12 - Gráficos da taxa de entrada nos braços abertos do LCE



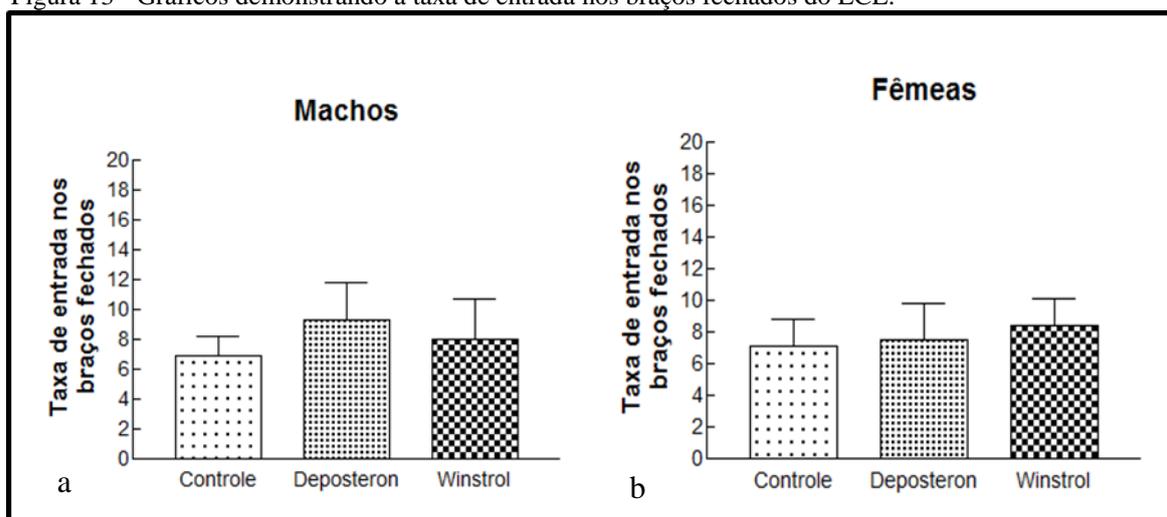
Notas: (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do Autor.

6.1.2 Resultados da taxa de entrada nos braços fechados

O parâmetro de entrada nos braços fechados do LCE não apresentou diferenças significativas como demonstra a Figura 13 tanto em machos como em fêmeas dos grupos experimentais em relação ao grupo controle.

Figura 13 - Gráficos demonstrando a taxa de entrada nos braços fechados do LCE.



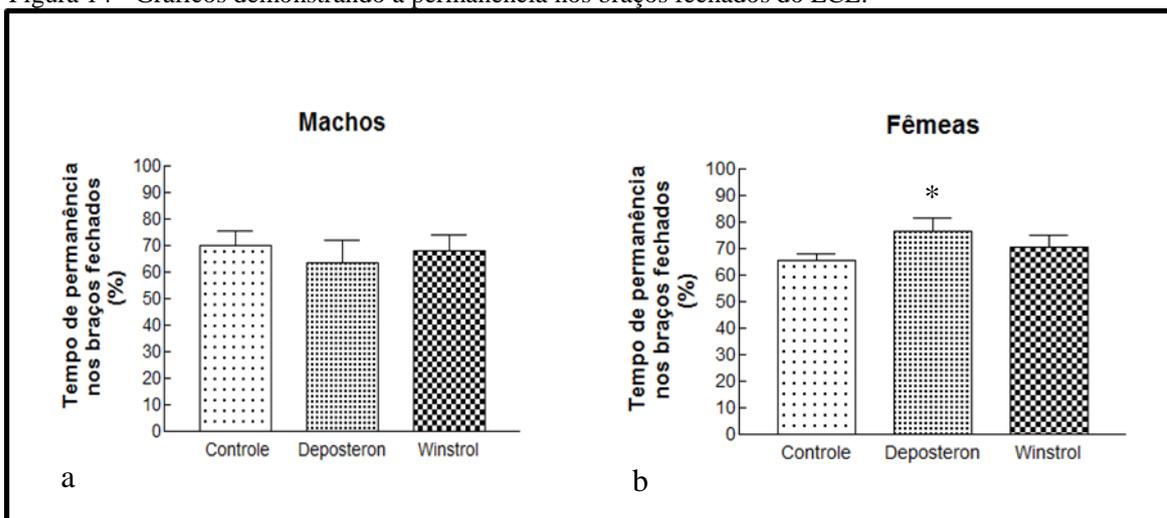
Nota: Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: Do Autor.

6.1.3 Resultados do tempo de permanência nos braços fechados

Conforme representação na Figura 14, podemos observar valores estatisticamente significantes no tempo de permanência nos braços fechados entre os grupos fêmea controle e fêmea Deposteron® (14b). O tempo de permanência destes animais tratados nos braços fechados do LCE aumentou, quando comparados com os animais do grupo controle, o que nos mostra também um quadro aparente de ansiedade nos animais tratados. Entretanto, não encontramos resultados significativos para o tempo de permanência nos braços fechados entre os animais machos, representado pela figura 14a.

Figura 14 - Gráficos demonstrando a permanência nos braços fechados do LCE.



Notas: Em **a** não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$); em **b** (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

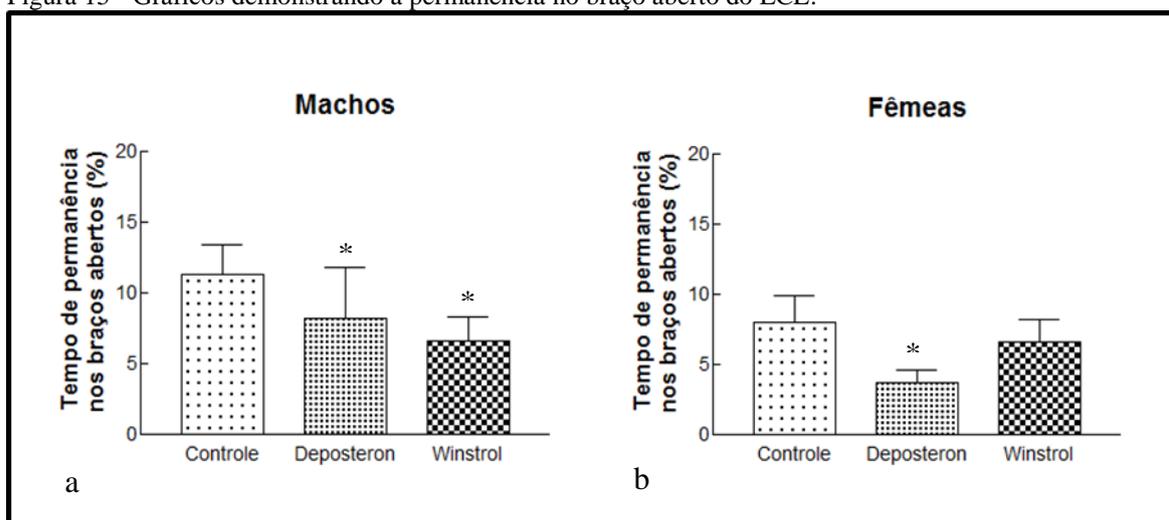
Fonte: Do Autor.

6.1.4 Resultados do tempo de permanência nos braços abertos

Conforme representação na Figura 15, podemos observar valores estatisticamente significantes no tempo de permanência nos braços abertos dos grupos machos Winstrol® e machos Deposteron® em relação ao grupo de machos controle (15a), sendo que esse tempo de permanência diminuiu.

O mesmo foi observado nos grupos de fêmeas Deposteron® em relação as fêmeas controle, representado na figura 15b, e o tempo de permanência desses animais tratados também diminuiu nos braços abertos do LCE. Com esses resultados podemos inferir que, nos animais machos tratados com Winstrol® e Deposteron® e nas fêmeas tratadas com Deposteron®, houve novamente um quadro de aparente ansiedade nestes animais tratados, comparados com os animais do grupo controle de ambos os sexos.

Figura 15 - Gráficos demonstrando a permanência no braço aberto do LCE.



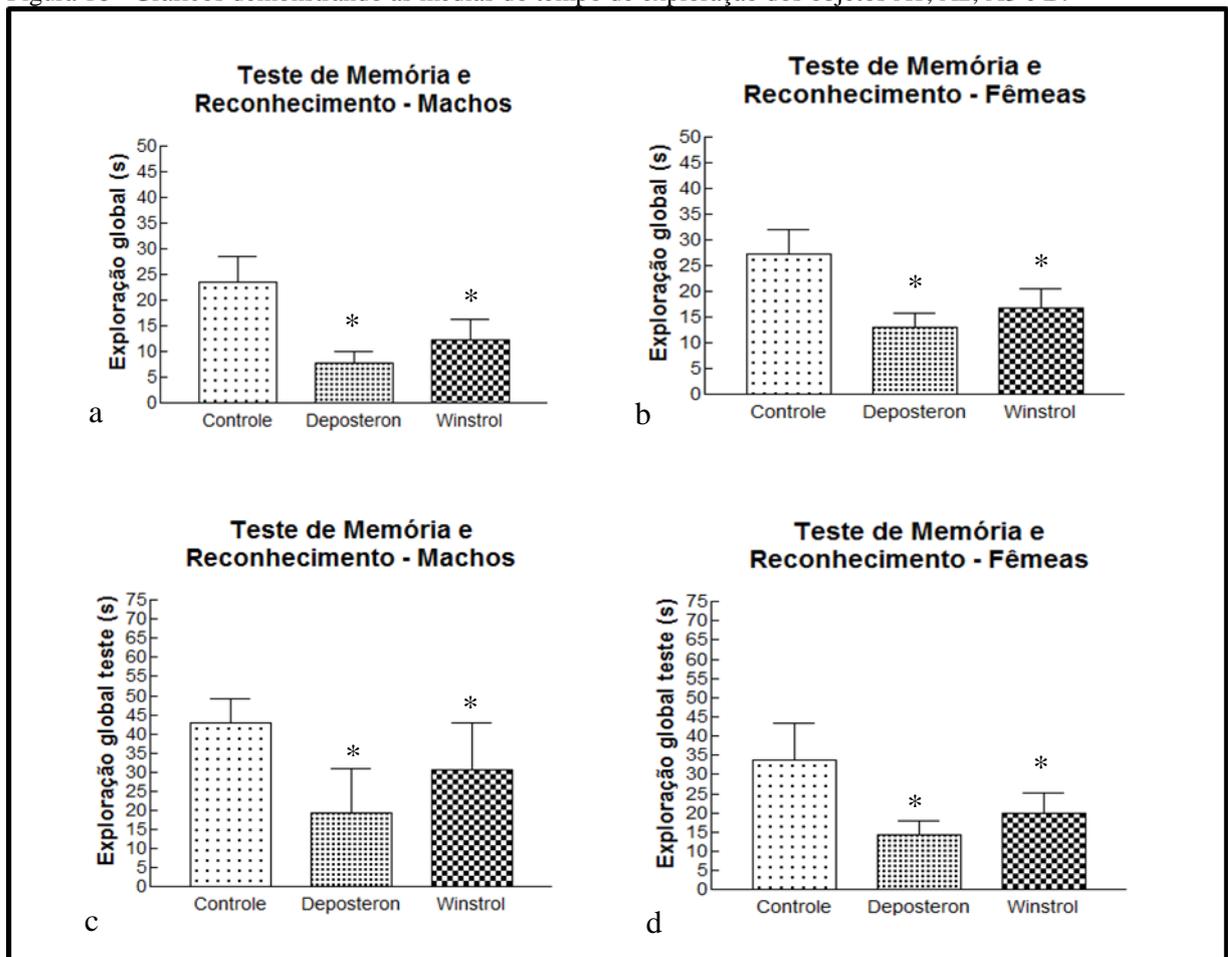
Nota: (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.
 Fonte: Do Autor.

6.2 TESTE DE MEMÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS

No teste de memória e reconhecimento de objetos, os animais passaram pelas etapas de *familiarização*, *teste* e *experimento*. Os resultados obtidos a partir da etapa de *teste* estão expressos nas Figuras 16a e 16b, através da fórmula de EG, e os resultados obtidos na etapa de *experimento* estão expressos nas Figuras 16c e 16d. A avaliação do teste de reconhecimento espontâneo de objetos é dada pela taxa de discriminação apresentada pelas Figuras 17a e 17b.

No presente estudo, podemos identificar alterações comportamentais tanto em machos como em fêmeas tratados com esteroides, estas alterações estão relacionadas à diminuição na capacidade de EG, conforme demonstra os dados obtidos nas Figuras 16a e 16b em ambos os sexos; além da diminuição da capacidade de exploração dos objetos A3 e B na etapa de *Experimento* (Figuras 16c e 16d) também em ambos os sexos. Identificamos assim, um comportamento de sonolência e apatia nesses animais, sendo estas alterações constituintes de comportamento doentio.

Figura 16 - Gráficos demonstrando as médias do tempo de exploração dos objetos A1, A2, A3 e B.

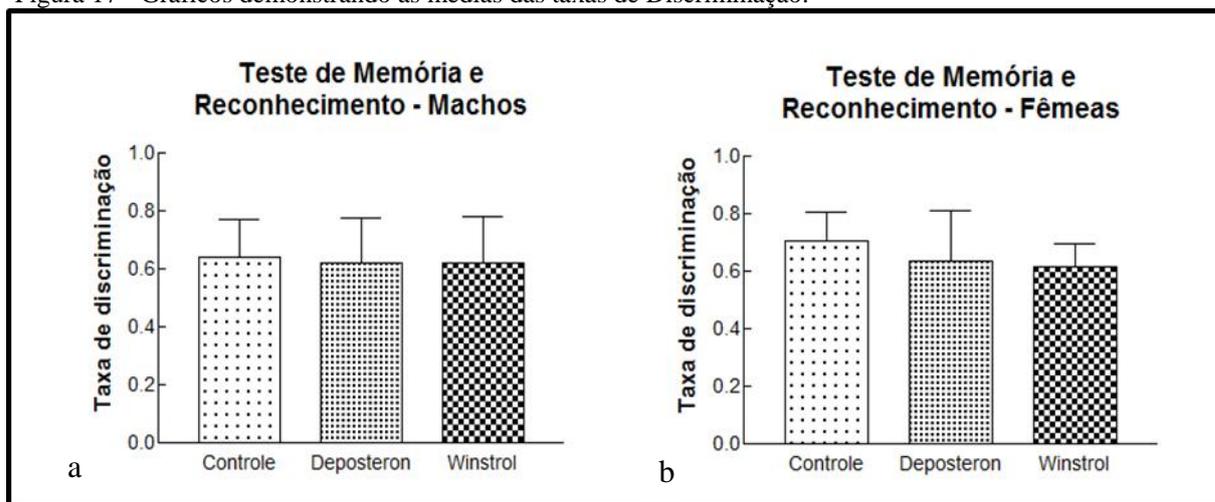


Notas: Médias obtidas a partir da soma da exploração dos dois objetos (A1 e A2) da etapa de teste e dos objetos A3 e B ; (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do Autor.

Porém, não encontramos resultados estatisticamente significantes na *Taxa de Discriminação ou Reconhecimento* (Figuras 17a e 17b), o que indica que não houve danos deletérios na capacidade de retenção de memória em curto prazo nos animais tratados.

Figura 17 - Gráficos demonstrando as médias das taxas de Discriminação.



Notas: Taxas obtidas através da razão entre a exploração do objeto novo (B) menos a exploração do objeto já conhecido (A3), divididos pela exploração de B mais a exploração de A3 (segundos de tempo); Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

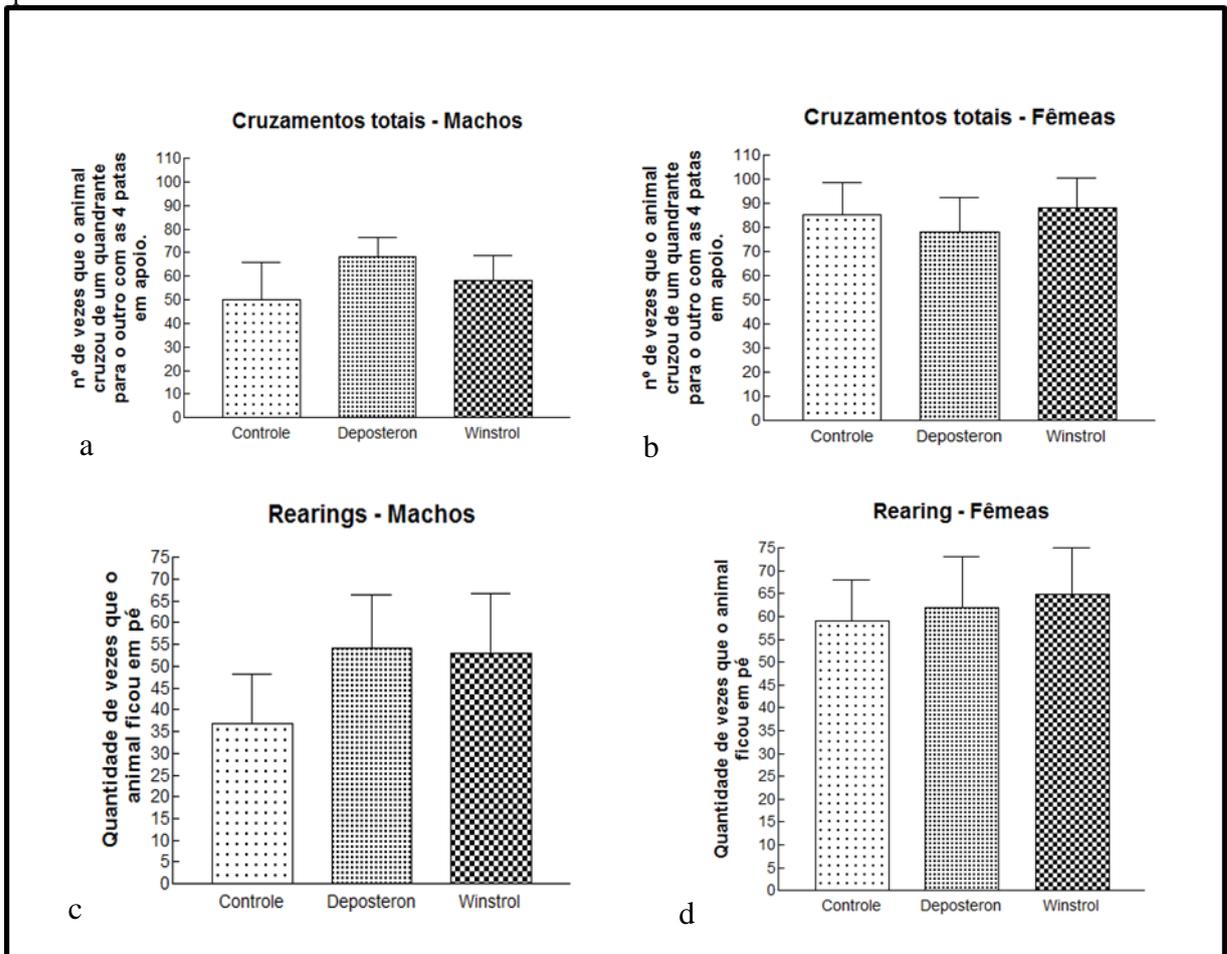
Fonte: Do Autor.

6.3 ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA NO CAMPO-ABERTO

As Figuras 18 e 19 mostram os efeitos da administração de EAAs sobre a atividade geral dos animais observados no campo aberto.

Foi observado que não houve diferença significativa na locomoção total (Figuras 18a e 18b), número total de *rearings* (Figuras 18c e 18d), permanência nos quadrantes adjacentes (Figuras 19a e 19b) e efeito anti-tigmotático (Figuras 19c e 19d).

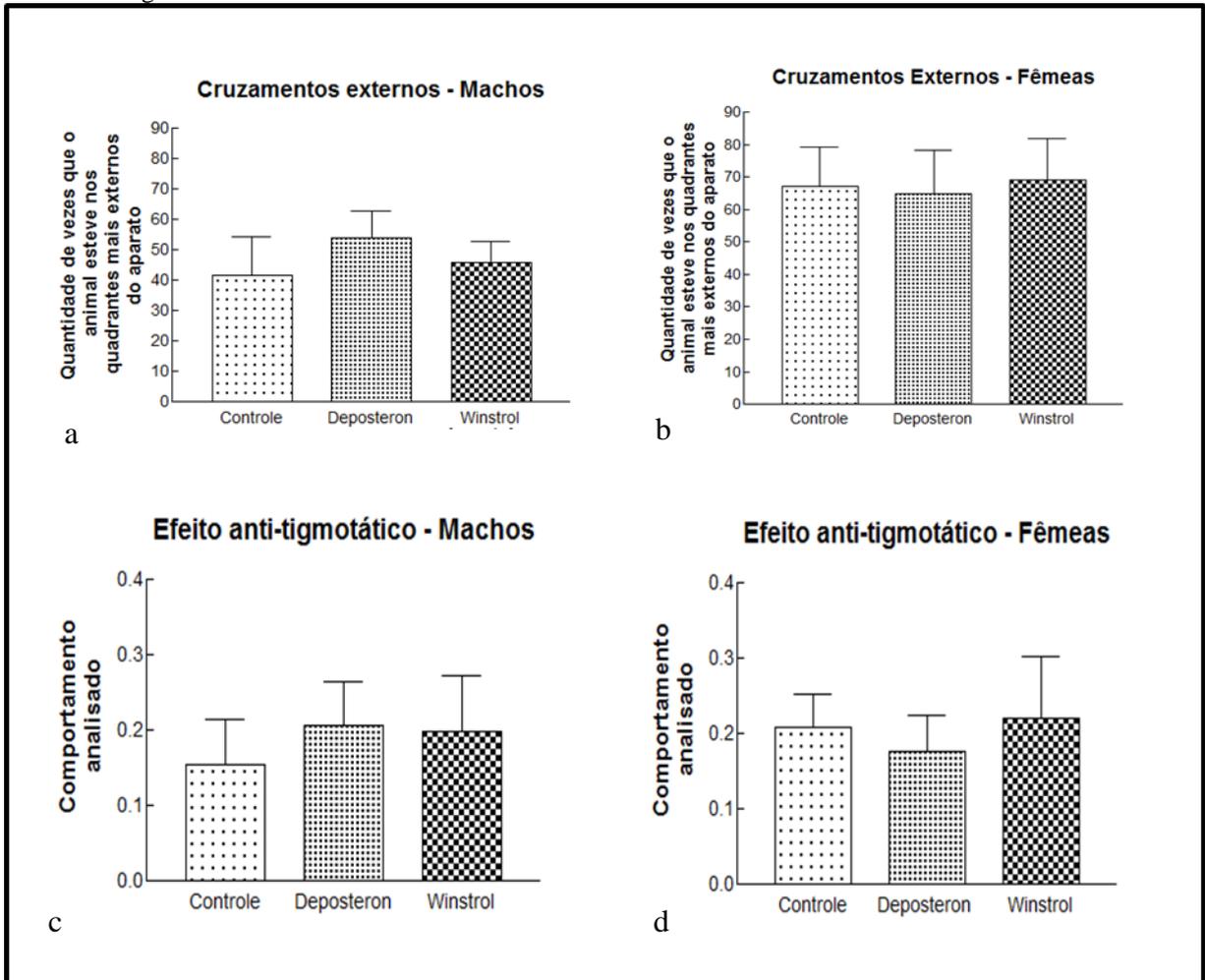
Figura 18 - Gráficos demonstrando a locomoção total e o número de vezes em que os animais ficaram em pé.



Nota: Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: Do Autor.

Figura 19 - Gráficos demonstrando a permanência dos animais nos quadrantes adjacentes do aparato e o efeito anti-tigmotático.



Nota: Comportamento analisado - a tendência do animal permanecer nos quadrantes adjacentes à parede do aparato; Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

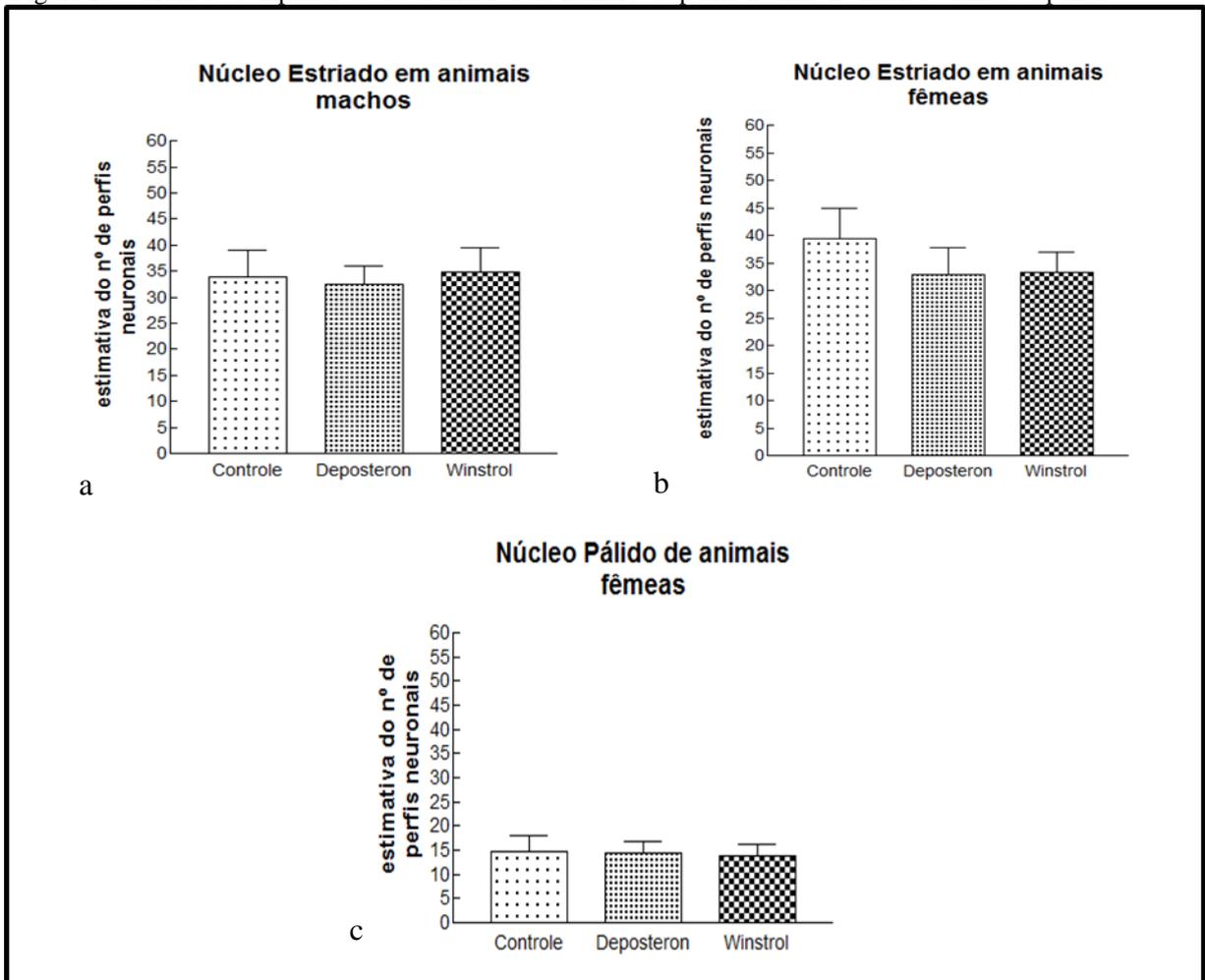
Fonte: Do Autor.

6.4 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

De acordo com os resultados obtidos, conforme demonstra a Figura 20, pode-se observar que não houve diferenças significativas do número de perfis neuronais no Ne de machos (Figura 20a), sendo a média do número de perfis dos grupos: Controle (33,7), Deposteron (32,5) e Winstrol (34,7); no Ne de fêmeas (Figura 20b), com a média do número de perfis dos grupos: Controle (37,5), Deposteron (33,3) e Winstrol (33,2); e no Np de fêmeas (Figura 20c), sendo que a média do número obtido de perfis celulares são: Controle (16),

Deposteron (15,4) e Winstrol (13,8); quando comparados os grupos experimentais com o grupo controle.

Figura 20 - Gráficos comparativos da estimativa do número de perfis neurais no núcleo estriado e pálido .

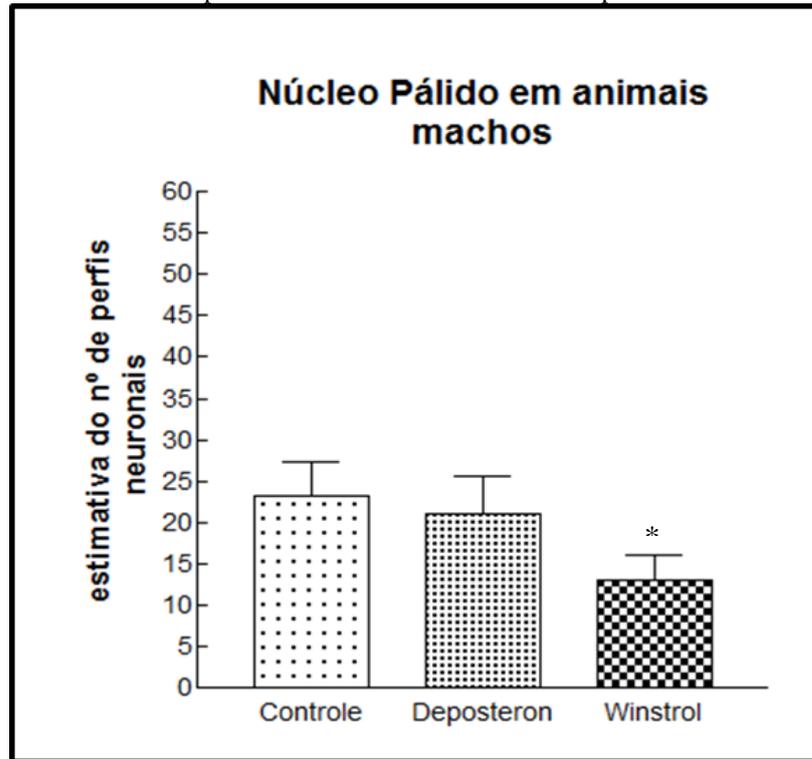


Nota: Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: Do Autor

Entretanto pode-se observar uma diminuição estatisticamente significativa no número de perfis neurais no Np dos animais machos tratados, demonstrado na Figura 21, sendo que as médias do número obtido de perfis celulares são: Controle (23,2), Deposteron (21) e Winstrol (13).

Figura 21 - Gráfico comparativo da estimativa do número de perfis neurais no núcleo pálido.



Nota: (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do Autor.

7 DISCUSSÃO

7.1 TESTE DE ANSIEDADE

Neste estudo encontramos dados que indicam que o tratamento favorece o aparecimento de maior ansiedade nos animais, retratada na menor porcentagem de entradas nos braços abertos (área mais aversiva), um índice amplamente aceito de aumento de ansiedade neste teste assim como demonstrado por Pellow et al. (1985), Lister (1987), File et al. (1990), Carobrez e Bertoglio (2005).

Rocha (2006) concluiu que o tratamento de DN com diazepam, alterou a porcentagem do tempo e no número de entradas nos braços abertos, sugerindo que estas substâncias também induzem aumento no nível de ansiedade em ratos de laboratório.

Este estudo, sendo classificado como um tratamento crônico, os resultados encontrados se diferem aos de Bitran et al. (1993) que encontrou resultados diferentes comparando o tratamento agudo e crônico em animais tratados com o propionato de testosterona. Com 6 dias de tratamento, os animais aumentaram a exploração nos braços abertos, isto é, teve um efeito ansiolítico. Porém com 14 dias de tratamento, os animais tratados não foram diferentes do grupo controle.

Marcondes et al. (2001) ao estudarem a influência do ciclo estral sobre o nível de ansiedade em ratas submetidas ao LCE, durante as quatro fases do ciclo estral, relataram que ratas em proestro apresentaram menores níveis de ansiedade do que no diestro. No proestro, são observados os maiores níveis de estradiol, em oposição aos menores níveis destes hormônios encontrados durante o diestro. O tratamento de fêmeas, na fase de diestro, com estradiol induziu um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos, cancelando a diferença observada entre esta fase e o proestro, confirmando a ação ansiolítica do estradiol. Alguns estudos demonstraram os efeitos da diferença sexual sobre o comportamento animal no LCE, observando que as fêmeas são menos ansiosas que machos (BRIDGES; STARKEY, 2004; RENARD et al., 2005; HOFFMANN et al., 2005).

Assim, torna-se difícil comparar o efeito dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) sobre a ansiedade entre machos e fêmeas. De acordo com Fernandez-Guasti e Martinez-Mota (2005) e Rojas-Ortiz et al. (2006), a investigação da ansiedade em animais sob tratamento com EAA, tem produzido resultados mistos, mostrando que estas substâncias

podem apresentar efeitos ansiogênicos, ansiolíticos ou não afetar a ansiedade desses animais. Com estes dados podemos justificar a diferença de resultados entre fêmeas Winstrol® em comparação com as fêmeas Deposteron®.

Além disso, observamos um alto grau de agressividade nos animais machos tratados. Toda sessão de tratamento e natação encontrávamos animais machucados, inclusive perdemos alguns animais em brigas (figuras 22A, 22B e 22C). Resultados semelhantes foram encontrados por vários autores, os quais relatam comportamento agressivo, ansiedade, depressão e medo excessivo (POPE; KATZ, 1988; SCHULTE et al., 1993; CORRIGAN, 1996; AMBAR, 2008; AGIS-BALBOA et al., 2009).

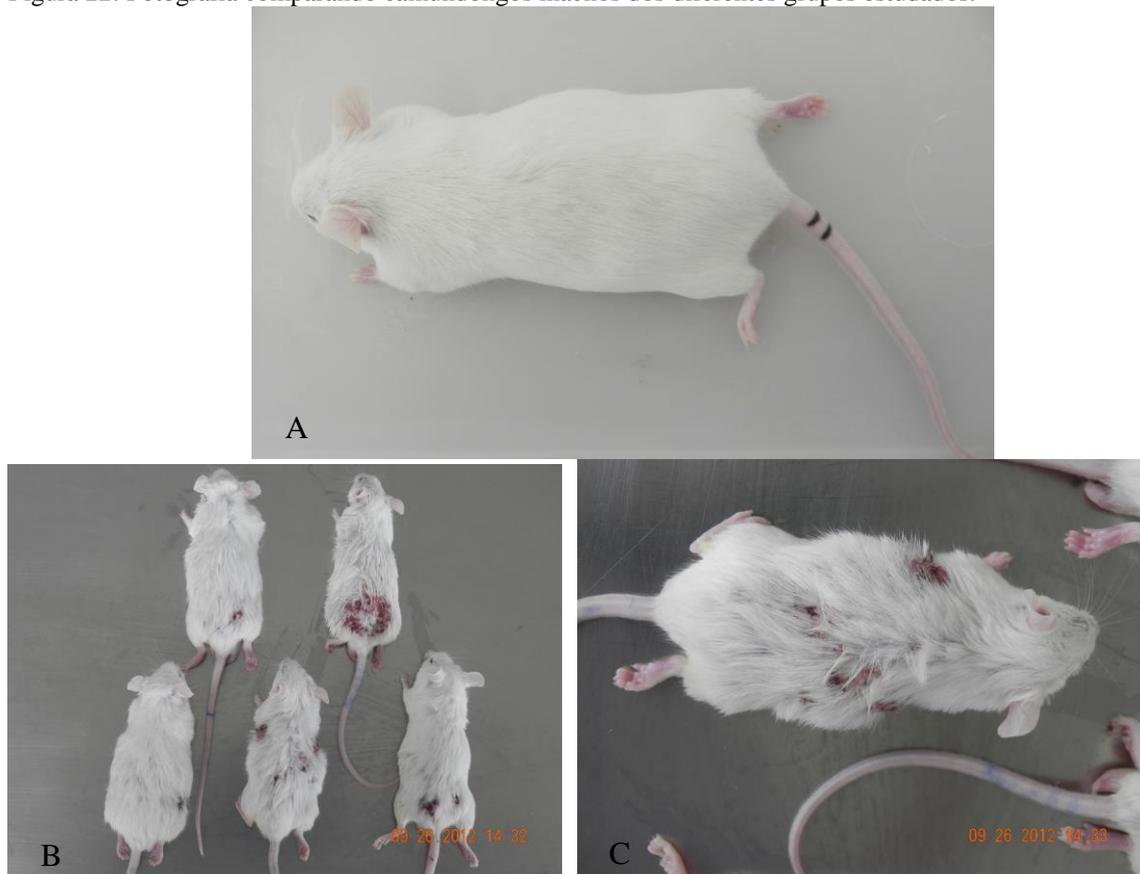
Ambar (2008) estudou camundongos tratados com DN cronicamente e estes apresentaram diminuição na quantidade de RNAm do receptor dopaminérgico D1 nos núcleos caudado-putâmem e núcleo *acumbens*, receptor também implicado à modulação do comportamento agressivo.

Segundo um trabalho recente de Büttner et al. (2001), um jogador de basquete de 33 anos de idade, veio a falecer devido à um infarto do miocárdio. Em um exame neuropatológico foi encontrado uma calcificação bilateral simétrica, conhecida como Doença de Fahr (DF), envolvendo os núcleos da base. A causa da DF foi correlacionada com o uso de EAA por muitos anos por esse jogador. Kümmer et al., (2006) relata que a Doença de Fahr (DF) é paradigmática para os estudos que relacionam os núcleos da base não apenas à motricidade, mas a diferentes aspectos do comportamento humano. Isso porque a DF acomete preferencialmente o globo pálido, embora seja frequente a calcificação em outras regiões, como em pacientes já relatados. As estruturas dos núcleos da base, ao constituírem os circuitos frontal-subcorticais, também denominados frontoestriatais, facilitariam determinados comportamentos em detrimento de outros comportamentos conflitantes e, conseqüentemente, comportamentos agressivos.

O neurotransmissor inibitório GABA também tem sido implicado na agressividade em várias espécies e através de diferentes modelos comportamentais de agressividade, seu papel parece complexo ao passo que o GABA tem suprimido (POTEGAL et al., 1982; HAUG et al., 1984; CLEMENT et al., 1987) e facilitado (STORK et al., 2000; WEERTS et al., 1993) o comportamento agressivo.

Após os resultados destes experimentos citados acima, não é surpreendente, portanto, que alterações comportamentais estejam presentes nos animais tratados.

Figura 22: Fotografia comparando camundongos machos dos diferentes grupos estudados.



Nota: A – Macho grupo controle sem alterações significativas na pele;
 B e C – Machos do grupo tratado com Deposteron® e Winstrol®, respectivamente, mostrando as feridas provocadas por brigas com outros animais, que estavam na mesma caixa durante o experimento.
 Fonte: Do autor.

7.2 TESTE DE MEMÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Neste estudo conseguimos observar a diminuição na capacidade de *Exploração Global* em ambos os sexos; além da diminuição da capacidade de exploração dos objetos A3 e B na etapa de *Experimento* também em ambos os sexos. E observamos que não existe diminuição da capacidade de reconhecimento do objeto novo após a utilização dos anabolizantes, ou seja, o tratamento não foi capaz de alterar a capacidade de retenção de memória em curto prazo em camundongos machos e fêmeas. Podemos deduzir, através desses resultados, que os EAA não afetaram a área da memória dos núcleos estudados, segundo estudos realizados por Packard et al. (1989) e Knowlton et al (1996).

Kalinine (2011) encontrou resultados contrários, no qual relatou que na fase de evocação (teste) os animais do tratamento subcrônico com DN não apresentaram nenhum

efeito sobre a memória espacial. Já no tratamento crônico os animais tratados apresentaram sutis efeitos deletérios sobre a memória espacial. Magnusson et al. (2009) relatou prejuízos na memória espacial de ratos tratados com DN na dose de 15mg/Kg tanto nos dias de treino (fase de consolidação), quanto no dia do teste (fase da evocação). Esses resultados se assemelham ao do presente estudo, já que os animais tratados com EAAs apresentaram uma diminuição na exploração global e global teste, quando comparados aos animais controle.

No parâmetro analisado da memória, o contrário foi observado por Middleman et al. (1995) o qual observou que um dos efeitos negativos do abuso de EAA é o esquecimento; e Simerly et al. (1990), relata que entre os animais do grupo tratado, observou-se prejuízo no aprendizado da memória de curta duração (90 min após o treino).

7.3 CAMPO ABERTO

Esse método parece ser apropriado para demonstrar possíveis diferenças entre animais normais e animais com danos cerebrais em termos de suas habilidades para adquirir e utilizar informação espacial, bem como para habituação à atividade exploratória com o decorrer do tempo. O teste de campo aberto é um dos instrumentos mais utilizados na avaliação comportamental e da função motora de animais. Dados como aumento do tempo despendido na parte central do campo aberto é indicativo de ansiólise, locomoção aumentada pode ser um indicativo de um efeito estimulante, enquanto diminuição da locomoção e da frequência com que o animal permanece sobre as patas traseiras é relatada como sedação (SACHETTI et al., 2009). Além disso, a avaliação do efeito anti-tigmotático mostra a diminuição da preferência típica, relacionado à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003; VILELA et al., 2009).

Observamos nesse estudo que não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros analisados, isto é, para a frequência de locomoção, frequência de levantar (rearing), permanência nos quadrantes adjacentes às paredes da arena e na razão entre o número de linhas centrais cruzadas no centro sobre o total de linhas cruzadas (efeito anti-tigmotático), para os animais tratados com as substâncias anabolizantes quando comparados aos animais controle. Isso nos mostra que os EAAs não alteraram o padrão motor dos animais assim como encontrado por Valle (1970), Prut e Belzung (2003), Teixeira (2012), Sachetti et al. (2009). Porém, Ambar (2008) encontrou resultados diferentes em animais tratados com

DN, no qual os animais apresentaram um aumento na locomoção total e também no comportamento de levantar (rearing).

Com esses dados, podemos inferir que a dose utilizada ou o tempo de tratamento nesse estudo não foram suficientes para alterar a atividade motora dos animais tratados.

7.4 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE PERFIS CELULARES DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Pode-se observar, após análise morfométrica, que houve uma diminuição estatisticamente significativa no número de perfis neurais no Np dos animais machos tratados com Wistrol®, comparados aos animais controle. Esse resultado se assemelha ao encontrado por Damião et al. (2012), que demonstrou uma diminuição significativa na quantidade de corpos celulares de neurônios no córtex cerebral de camundongos tratados com esteroides anabolizantes, quando comparados com o grupo controle; e Kalinine (2011) cujos estudos demonstram que os EAA podem ter atividade deletéria sobre o SNC de humanos, se manifestando por alterações morfológicas, funcionais e comportamentais.

Tucci et al (2012) e Talih et al (2007) demonstraram que recentes modelos animais tratados com uso crônico e abusivo de EAA (stanozolol) reduziram os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é uma proteína endógena responsável por regular a sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica do sistema nervoso periférico e central, sendo que a redução dos níveis dessa substância levaria à morte neuronal e consequente diminuição do número de perfis neuronais, como relatado neste presente estudo.

Estudos recentes (MCINTYRE et al., 2002; CLARK et al., 2006) estão começando a investigar mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de EAA em roedores. O uso crônico de EAA em camundongos mostrou-se indutor de mudanças dependentes de dose, sexo e idade na expressão gênica da subunidade do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores, sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico. Essas mudanças na expressão gênica da subunidade do receptor poderia gerar a morte dos neurônios do Núcleo Pálido dos animais tratados, já que as células desse núcleo são essencialmente GABAérgicos (HAINES, 1997).

Ballard e Wood (2005) afirmam que existem 3 tipos principais de modificações da molécula de testosterona tais como: a hidroxilação na posição C-10 para aumentar a potência

relativa (p.ex., nandrolona); esterificação para diminuir a taxa de inserção em circulação (por exemplo, cipionato de testosterona; Pavlatos, Fultz, Monberg, e Vootkur, 2001); e alquilação na posição C-17 para reduzir a primeira passagem do metabolismo no fígado, permitindo assim a administração oral (por exemplo, estanozolol; Gallaway, 1997; Taylor, 2002; Yesalis, 2000). Através disso podemos inferir que a ação do Winstrol® foi maior que a do Deposteron® devido ao processamento pelo qual o Winstrol® (Stanozolol) passou (alquilação na posição C-17), que permitiu a utilização desse por via oral. Porém a administração do Winstrol® nesse experimento foi feita por meio IP, podendo ter sido mais eficaz pelo fato de não passar através do processo de digestão no estômago e, assim, ter sido maior e mais rápida a sua absorção pelo organismo.

8 CONCLUSÕES

- Os resultados apresentados dos estudos comportamentais, somados aos estudos quantitativos, nos permite concluir que houve uma diminuição de perfis neuronais no Np dos animais machos tratados com Winstrol Depot®.
- Os animais em tratamento com os esteroides anabólicos androgênicos Winstrol Depot® e Deposteron® mostraram um quadro de ansiedade e apatia, porém não afetou a memória recente e nem a capacidade locomotora.

REFERÊNCIAS

- ABE, H; ISHIDA, Y; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neurosci Lett**. v. 356, p. 191-194. 2004.
- AGIS-BALBOA R. C et al. Enhanced fear responses in mice treated with anabolic androgenic steroids. **Neuroreport**. v. 20, n. 6, p. 617-621. 2009.
- AHERNE, W.A and DUNNILL, M.S. **Morphometry**. London: Edward Arnold, 1982. p. 205.
- AMBAR G. **Efeitos da administração prolongada do esteroide anabolizante decanoato de nandrolona em comportamentos emocionais e na expressão de genes relacionados ao sistema serotoninérgicos em diferentes áreas cerebrais de camundongos**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo. 2008.
- ATKINSON, R.C.; SHIFFRIN, R.M. Human memory: a proposed system and its control processes. In: K.W. Spence and J.T. Spence (Eds). **The Psychology of Learning and Motivation Advances and Research and Theory**. v. 2, Academic Press, New York, 89: 195, 1986.
- BADDELEY, A. Working-memory. **Science**. v. 255, p. 556-559. 1992.
- BADDELEY, A. Working memory. **Life Sci**. v. 321, p. 167-173, 1998.
- BAILEY, D.J. et al. Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. **Behav Neurosci**. v. 113, p. 276-282. 1999.
- BALLARD, C. L.; WOOD, R. I. Intracerebroventricular Self-Administration of Commonly Abused Anabolic-Androgenic Steroids in Male Hamsters (*Mesocricetus auratus*): Nandrolone, Drostanolone, Oxymetholone, and Stanozolol. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 752-758, 2005.
- BITRAN, D; LELLOGD, C.K; HILVERS, R.J. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA receptors in the rat. **Horm Behav**, v. 27, n. 4, p. 568-83, 1993.
- BJARKAM, C.R.; PEDERSEN, M.; SORENSEN, J.C. New strategies for embedding, orientation and sectioning of small brain specimens enable direct correlation to MR-images, brain atlases, or use of unbiased stereology. **J Neurosci Methods**. v. 108, p. 153-159. 2001.
- BOLENDER, R.P. Stereology: applications to pharmacology. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 21, p. 549-573. 1981.
- BOLENDER, R.P. Stereology and its uses in cell biology. **Ann NY Acad Sci**. v. 383, p. 1-16, 1982.

BRIDGES, N.J.; STARKEY, N.J. Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. **Physiol Behav**, v. 83, n. 1, p. 119-127, 2004.

BRODAL, A. **Neurological Anatomy In Relation to Clinical Medicine**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1984. p. 888.

BROWER, K.J. et al. Evidence for physical and psychological dependence on anabolic androgenic steroids in eight weight lifters. **Am J Psychiatry**. v. 147, p. 510-2, 1990.

BROWN, M.W.; AGGLETON, J.P. Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 51-61, 2001.

BÜTTNER, A. et al. Progressive Idiopathic Bilateral Striato-Pallido-Dentate Calcinosi (Fahr's disease) in a person with anabolic steroid abuse. **Legal Medicine**, v. 3, p. 114-118, 2001.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CHARLESTON, L.B. et al. An improved method for the production of slides from oversized samples of glycol methacrylate-embedded tissues: Application for optical disector based stereology. **J Histotechnol**. v. 26, p. 49-52, 2003.

CLARK, A.S. et al. Sex and Age Specific Effects of Anabolic Androgenic Steroids on Reproductive Behaviors and on GABAergic Transmission in Neuroendocrine Control Regions. **Brain Research**, v. 1126, n. 1, p. 122-138, 2006.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L.P. Behavioral and Physiological Responses to Anabolic-androgenic Steroids. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 27, n. 5, p. 413-436, 2003.

CLEMENT, J. et al. Age-dependent changes of brain GABA levels, turnover rates and shock-induced aggressive behavior in inbred strains of mice. **Pharmacol. Biochem. Behav**. v. 26, p. 83-88, 1987.

CORRIGAN B. Anabolic steroids and the mind. **Med J Aust**, v. 165, p. 222-226, 1996.

CUNHA, T.S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n. 2, 2004.

DAMIÃO, B.; SOUSA, G.G.; NOGUEIRA, D.A.; ROSSI JR, W.C.; FERNANDES, G.J.M.; ESTEVES, A. Quantificação de corpos celulares de neurônios em camundongos submetidos a esteroides anabolizantes. **Revista Neurociências**, v.20, n. 1, p. 68-72, 2012.

DAVEY, M.G. et al. Computer-assisted stereology: Point fraction of lung parenchyma and alveolar surface density in fetal and newborn sheep. **Scanning**, v. 25, p. 37-44, 2003.

EDWARDS, J.G. Clinical anxiety and its treatment. **Neuropeptides**. v. 19, p. 1-10, 1991.

FERNANDEZ-GUASTI, A; MARTINEZ-MOTA, L. Anxiolytic-like actions of testosterone in the burying behavior test: role of androgen and GABA-benzodiazepine receptors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p.762–770, 2005.

FILE, P.S. et al. Characterization of phenomenon of ‘one-trial tolerance’ to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 98-101, 1990.

FISCHER, S. G.; RICCI, L. A.; MELLONI JR, R. H. Repeated anabolic/androgenic steroid exposure during adolescence alters phosphate-activated glutaminase and glutamate receptor 1 (GluR1) subunit immunoreactivity in Hamster brain: correlation with offensive aggression. Behavioural. **Brain Research**, v. 180, n. 1, p. 77-85, 2007.

FREY, U.; HUANG, Y.Y; KANDEL, E.R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. **Science**. v. 260, p. 1661-1664, 1993.

GALLAWAY, S. **The steroid bible**. Honolulu. HI: Belle International. 2001.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory; effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**. v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an animal model of anxiety. **Neurosci Biobehav Ver**. v. 23, p. 237-246, 1998.

GRIMMES, J. M.; RICCI, L.A.; MELLONI, R.H. Plasticity in anterior hypothalamic vasopressin correlates with aggression during anabolic/androgenic steroid withdrawal in hamsters. **Behav Neurosci**, v. 120, n.1, p. 115-124, 2006.

HAINES, D. E. **Fundamental of Neuroscience**. Churchill Livengstone, New York. 1997. p. 363-378.

HALLBERG, M. et al. Anabolic-androgenic steroids affect the content of substance P and substance P1–7 in the rat brain. **Peptides**, v. 21, n. 6, p. 845-852, 2000.

HAUG, M. et al. Influence of castration and brain GABA levels in three strains of mice on aggression towards lactating intruders. **Physiol. Behav**. v. 32, p. 767–770, 1984.

HOFFMAN D.A; Tiagabine for rage, aggression, and anxiety. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. v. 17, n. 2, p. 252, 2005.

IZQUIERDO, I. et al.. Mechanisms for memory types differ. **Nature**. v. 393, p. 18, 1998.

KALININE E. **Efeitos Comportamentais, Neuroquímicos e Metabólicos do Tratamento com Decanoato de Nandrolona em Camundongos**. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

KAM, P.C.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. **Anaesthesia**, v. 60, n. 7, p. 685-92, 2005.

KNOWLTON, B.J.; MANJELS, J.A.; SQUIRE, L.R. A neostriatal habit learning system in humans. **Science**. v. 273, p. 1399-1402, 1996.

KOCHAKIAN, C.D. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. **Wien Med Wochenschr**. v. 143, n. 14-15, p. 359-363, 1993.

KOCHAKIAN, C.D.; YESALIS, C.E. **Anabolic-androgenic steroids: A historical perspective and definition**. In: YESALIS, C.E. Anabolic steroids in sports and exercise, 2ª edição, Champaign, Kinetic Humans, cap.1, 2000. p.17-50.

KUBINOVA, L.; JANACEK, J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. **Microsc Res Tech**. v. 53, p. 425-435, 2001.

KUBINOVA, L. et al. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. **J Muscle Res Cell Motil**. v. 22, p. 217-227, 2001.

KÜMMER, A. et al. Alterações comportamentais graves em paciente com doença de Fahr. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n.3, p. 645-649, 2006.

LAZO, J.S. et al. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. v.92, p. 180-185, 1987.

LOUGHTON, S.J.; RUHLING, R.O. Human strength and endurance responses to anabolic steroids and training. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 17, n. 3, p. 285-96, 1977.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 344.

MACHADO, N.H.S. et al. **Esteróides anabolizantes: efeitos anabólicos e andrógenos**. Faculdade de Farmácia do Planalto Central, Brasília, 2002.

MAGNUSSON, K. et al. Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats. **Neurosci Lett**. v. 467, n. 3, p. 189-193, 2009.

MAHMOOD, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1177-1192, 2007.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Manual de quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria e Estereologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994.

MANDARIM-DE-LACERDA, CA. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MARAVELIAS, C. et al. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 3, p. 167-75, 2005.

MARCONDES, F.K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol. Behav.** v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

MARTINI, L. The 5α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures: Biochemical and physiological implications. **Endocr Rev.** v. 3, n. 1, p.1-25, 1982.

MCINTYRE, K. L.; PORTER, D. M.; HENDERSON, L. P. Anabolic androgenic steroids induce age-, sex-, and dose-dependent changes in GABAA receptor subunit mRNAs in the mouse forebrain. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 634-645, 2002.

MELLO, M.T. O exercício físico e os aspectos psicobiológicos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 11, n. 3, 2005.

MIDDLEMAN, A.B. Highrisk behaviors among high school students in Massachusetts who use anabolic steroids. **Pediatrics**, v. 96, p. 268-72, 1995.

MINKIN, D.M.; MEYER, M.E.; VAN HAAREN, F. Behavioral effects of longterm administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 44, p. 959-63, 1993.

NETO, W.M.G. **Esteróides anabólicos e outros ergogênicos**. In: NETO, W.M.G. Musculação: Anabolismo total, 6ª edição, Editora Phorte. cap.IV, 2002. p.99-101.

ORLANDO, R. et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. **Brain Research**, v. 1165, p. 21-29, 2007.

PACKARD, M.G.; HIRSH, R.; WHITE, N.M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **J Neurosci.** v. 9, p. 1465-1472, 1989.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H.J.G. Solutions to old problems in the quantitation of the central nervous system. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 129, p. 65-67, 1995.

PAVLATOS, A. M.; FULTZ, O.; MONBERG, M. J.; & VOOTKUR, A. Review of oxymetholone: A 17α -alkylated anabolic-androgenic steroid. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p. 789-801, 2001.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELUSO, M.A.M. et al. Alterações psiquiátricas associadas ao uso de anabolizante. **Rev Psiquiatria Clinica**, v. 27, n. 4, p. 123-131, 2000.

PEREIRA, L.M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Glomerular Profile Numerical Density per Area and Mean Glomerular Volume in Rats Submitted to Nitric Oxide Synthase Blockade. **Histol Histopathol.** v. 16, p. 15-20, 2001.

PEREIRA, L.M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Myocardial changes after spironolactone in spontaneous hypertensive rats: A laser scanning confocal microscopy study. **J Cell Mol Med.** v. 6, p. 49-57, 2002.

POPE, H.G.J.; KATZ, D.L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am J Psychiatry,** v. 45, n. 4, p. 487-490, 1988.

POTEGAL, M.; PERUMAL, A.S.; BARKAI, A.I.. GABA binding in the brains of aggressive and non-aggressive female hamsters. **Brain Res.** v. 247, p. 315–324, 1982.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol,** v. 463, p. 3-33, 2003.

RABINOWICZ, T. Structure of the cerebral cortex in men and women. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology,** v. 61, n. 1, p. 46-67, 2002.

RENARD, G.M. et al. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. **Physiol Behav.** v. 85, n. 3, p. 363-369, 2005.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 25, p. 835-853. 2001.

RIVAS-ARANCIBIA, S.; VAZQUEZ-PEREYRA, F. Hormonal modulation of extinction responses induced by sexual steroid hormones in rats. **Life Sci.** v. 54, n. 21, p. 363–367, 1994.

ROCHA, VM. **Efeito do esteroide anabólico nandrolona sobre o nível de ansiedade em ratos.** Piracicaba, 2006. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. 2006.

ROJAS-ORTIZ, Y.A. et al. Modulation of elevated plus maze behavior after chronic exposure to the anabolic steroid 17alpha-methyltestosterone in adult mice. **Horm. Behav.** v. 49, p. 123–128, 2006.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaiba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SCHAFE, G.E. et al. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci.** v. 24, n. 9, p. 540-546, 2001.

SCHULTE, H. M.; HALL, M.J.; BOYER, M. Domestic violence associated with anabolic steroid abuse. **The American Journal of Psychiatry,** v. 150, n. 2, p. 348, 1993.

SHAHIDI, N. T. A review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics.** v. 23, p- 1355-1390, 2001.

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

SIMERLY, R.B et al. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. **J Comp Neurol**, v. 294, p. 76-95, 1990.

SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. **Psychol Rev.** v. 99, n. 2, p. 195-231, 1992.

SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annu Rev Psychol.** v. 44, p. 453-495, 1993.

STORK, O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. **Brain Res.** v. 865, p. 45–58, 2000.

STRIEN, N.M.; CAPPAERT, N.L.M.; WITTER, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal – hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 272-282, 2009.

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. **Endocrine Journal**, Tokio, v. 51, n. 4, p. 425-34, 2004.

TALIH, F; FATTAL, O; MALONE, D.JR. Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. **Cleve Clin J Med.** v. 74, p. 341-4, 2007.

TAYLOR, W. N. **Anabolic steroids and the athlete.** Jefferson, NC: MacFarland & Co. 2002.

TEDRUS, G.M.A.S.; FONSECA, L.C.; NOGUEIRA JR, E. Calcificação nos Núcleos da Base na tomografia computadorizada: Correlação clínica em 25 pacientes consecutivos. **Arq Neuropsiquiatr**; v. 64, n. 1, p. 104-107, 2006.

TEIXEIRA, A. S. **Efeito da dexametasona no comportamento sexual de ratos machos.** 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Alfenas. 2012.

TEIXEIRA JR, A.L.; CARDOSO, F. Neuropsiquiatriados núcleos da base: uma revisão. **J. Bras. Psiquiatr**, v. 53, n. 3, p.153-158, 2004.

THIBLIN, I.; FINN, A.; ROSS, S.B. Stenfors Carina. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 6, p. 1301-1306, 1999.

TUCCI, P. et al. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol induced monoaminergic changes. **Steroids**, v. 77, p. 269-75, 2012.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VAZQUEZ-PEREYRA, F. et al. Modulation of short term and long term memory by steroid sexual hormones. **Life Sci.** v. 56, n. 14, p. 255–260, 1995.

VENÂNCIO, D.P. Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 3, p. 191-195, 2010.

VILELA, F. C et al. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 325-327, 2009.

World Anti-Doping Agency (WADA) World Anti-doping code, Montreal, 2010. Disponível em: <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/A-Brief-History-of-Anti-Doping/> Acesso em 24 abr 2014.

WAGNER, J.C. Enhancement of athletic performance with drugs. An Overview. **Sports Medicine**, v. 12, n. 4, p. 250-65, 1991.

WEERTS, E.M.; TORNATZKY, W.; MICZEK, K.A. Prevention of the pro-aggressive effects of alcohol in rats and squirrel monkeys by benzodiazepine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 111, p. 144–152, 1993.

WEST, M.J. New stereological method of counting neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 14, p. 275-285, 1993.

WEST, M.J. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. **Neurobiology of Aging**, v. 14, p. 287-293, 1993.

WILSON, J.; PRANGE, A.; LARA, P. Methyltestosterone with imipramine in men: conversion of depression to paranoid reaction. **Am J Psychiatry**, v. 131, p. 21-24, 1974.

WITTER, M.P. et al. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. **Prog Neurobiol.** v. 33, p. 161-253, 1989.

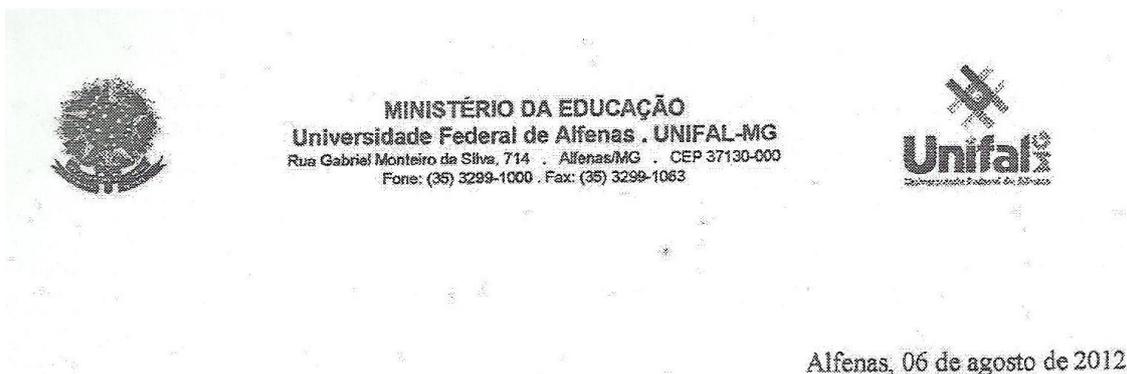
YANG, P.; JONES, B. L.; HENDERSON, L. P. Mechanisms of anabolic androgenic steroid modulation of $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ GABAA receptors. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 619-633, 2002.

YESALIS, C.E. **Anabolic steroids in sport and exercise**. Champaign, IL: Human Kinetics. 2000.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. **Science**. v. 250, p. 288-290, 1990.

ANEXO

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética



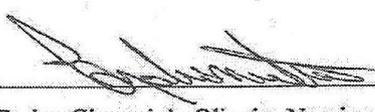
Alfenas, 06 de agosto de 2012.

Profª. Alessandra Esteves

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 414/2012, intitulado “Avaliação comportamental e análise morfoquantitativa de corpos celulares de neurônios nos núcleos da base em camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.



Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG