

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

MELISSA SIQUERIA RIBEIRO

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NEURÔNIOS DO CORPO AMIGDALOIDE E
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS SOB O USO DE
ESTEROIDES ANABOLIZANTES**

Alfenas/MG

2014

MELISSA SIQUEIRA RIBEIRO

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NEURÔNIOS DO CORPO AMIGDALOIDE E
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS SOB O USO DE
ESTEROIDES ANABOLIZANTES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Carlos Giovani de O. Nascimento.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Esteves.

Alfenas/MG

2014

Ribeiro, Melissa Siqueira.

Análise estereológica de neurônios do corpo amigdalóide e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes / Melissa Siqueira Ribeiro, Alfenas - 2014.

78 f. -

Orientador: Carlos Giovani de O. Nascimento.

Co-orientadora: Alessandra Esteves

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

Bibliografia.

1. Esteroides. 2. Neurônios. 3. Tonsila do Cerebelo. 4. Ansiedade. 5. Animais – comportamento agressivo. I. Nascimento, Carlos Giovani de O. II. Esteves, Alessandra III. Título.

CDD: 616.8

MELISSA SIQUEIRA RIBEIRO

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NEURÔNIOS DO CORPO
AMIGDALOIDE E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, pela Universidade Federal de Alfenas-MG

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em:

Prof.^o *Dr. André Luis Rezende Bianchi*

Instituição: *FMVZ-USP*

Assinatura: *ABianchi*

Prof.^o *Magnus Costa Rossi Junior*

Instituição:

Assinatura: *Magnus*

Prof.^o *Carlos Gomes de Sousa Brito*

Instituição: *UNIFAL*

Assinatura: *Carlos*

Dedico a Deus, ao meu amado companheiro e esposo, Diego, aos meus pais, Milton e Margareth e aos meus irmãos, Michelle, Fábio e Érika.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”.

CORA CORALINA

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento, orientador, pela oportunidade, apoio e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Esteves, co-orientadora, pelo acolhimento, pela dedicação, companheirismo e exemplos a cada dia desta jornada, exercendo papel essencial nesta conquista.

Aos professores e colegas do Laboratório de Fisiologia, em especial ao Prof. Dr. Renato Rizo Ventura, pelos ensinamentos.

Aos professores e colegas do Laboratório de Anatomia, em especial ao Prof. Dr. Wagner Costa Rossi Júnior e Prof. Dr. João de Carvalho, pelo acolhimento, apoio e humanidade.

Aos colegas de trabalho, Ariane Freitas, Bruno Damião, Juliane Lima, Débora Montoan, Dauanda Silva, Wagner Corsini, Gustavo Brunelli, Lídia Wiazowski e Melissa Ferreira pelo companheirismo e pela amizade.

Aos funcionários dos Laboratórios, Maria Aparecida (D^a Cida), Marina Venâncio, Marília Ramos, Edinaldo Rocha (Pitt) e José dos Reis, pelo apoio.

Aos funcionários do Biotério Central.

Aos animais experimentais.

RESUMO

Os esteróides anabólico-androgênicos (EAAs) são derivados sintéticos da testosterona utilizados de maneira abusiva por indivíduos que procuram ganho de força física ou apenas efeitos estéticos. Doses suprafsiológicas destes compostos têm sido associadas a possíveis danos em tecido nervoso, a efeitos emocionais e comportamentais adversos, como alteração nas respostas de ansiedade ou agressividade. Considerando o desconhecimento dos aspectos neurais envolvidos nestas alterações comportamentais, e os resultados de trabalhos que apontam para um possível efeito deletério dos EAAs no Sistema nervoso central (SNC), investigamos a integridade do número de neurônios da amígdala basolateral (ABL) e do núcleo póstero-ventral da amígdala medial (MePV) de camundongos machos e fêmeas. Os animais receberam injeções intraperitoneais de cipionato de testosterona (Deposteron®) e estanozolol (Winstrol Depot ®) em doses suprafsiológicas, duas vezes por semana, no período de 33 dias. Assim como um grupo controle recebeu solução salina estéril a 0,9% nos mesmos dias. Foi realizada a análise numérica de perfis de corpos celulares de neurônios para a quantificação dos mesmos e testes comportamentais. Os animais tratados apresentaram respostas ansiogênicas no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). No entanto, não foram observadas alterações na atividade motora geral em campo aberto (CA) e nos parâmetros de agressividade no teste de modelo residente-intruso. Os dois EAAs foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de corpos celulares de neurônios nas duas áreas analisadas, sugerindo um processo de morte neuronal induzido pelos EAAs.

Palavras-chave: Esteroides. Tonsilas do cerebelo. Ansiedade. Animais - comportamento agressivo.

ABSTRACT

The androgenic-anabolic steroids (AAS) are synthetic derivatives of testosterone abusively used by individuals looking to gain physical strength or aesthetic purposes. Supraphysiological doses of these compounds have been associated with possible damages to nervous tissue, emotional and behavioral adverse effects, such as changes in anxious or aggressive responses. Considering the lack of knowledge about the neural aspects involved in these behavioral changes, and researchs that point to a possible deleterious effect of AAS in the central nervous system (CNS), we investigated the integrity of the number of cell bodies of neurons of the basolateral amygdala (BLA) and the posteroventral medial amygdala nucleus (MePV) of male and female mice. The animals received intraperitoneal injections of testosterone cypionate (Deposteron ®) and stanozolol (Winstrol Depot ®) supraphysiological doses, twice a week in the period of 33 days. As a control group received 0.9% sterile saline solution on the same days. For quantification and behavioral tests, analyses on the number of cell bodies of neurons was performed. The treated mice showed an increase in anxiety-related behaviors in the elevated plus maze test, and no changes were observed in the general motor activity in the open field and parameters of aggressiveness in the resident-intruder test model. The two AAS were able to significantly reduce the number of neuronal cell bodies in both analyzed areas, suggesting a process of neuronal death due to apoptosis induced by the AAS.

Keywords: Steroids. Cerebellar tonsil. Anxiety. Animals - aggressive behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Modelo estrutural da molécula de testosterona, indicando as posições usuais das modificações para obtenção dos EAAs sintéticos.....	16
Figura 2-	Estrutura básica do sistema límbico humano e de roedores.....	22
Figura 3-	Vias eferentes da ABL.....	25
Figura 4-	Vias neuroanatômicas da agressividade em roedores.....	26
Figura 5-	Grupos de animais de acordo com o esteroide e a dosagem utilizada.....	31
Figura 6-	Recipiente utilizado para a natação dos animais.....	31
Figura 7-	Campo aberto (Insight®), utilizado para avaliação da atividade motora espontânea.....	33
Figura 8-	Labirinto em Cruz Elevado (Insight®) utilizado para os testes comportamentais referentes aos parâmetros de ansiedade.....	34
Figura 9-	Aparato utilizado para a realização do teste de agressividade.....	35
Figura 10-	Corte frontal de um cérebro de camundongo próximo as áreas estabelecidas para o estudo.....	36
Figura 11-	Delimitação de uma ABL e de onde foram estabelecidos os campos microscópicos aleatórios para contagem dos neurônios da área.....	38
Figura 12-	Delimitação de um núcleo MePV e de onde foram estabelecidos os campos microscópicos aleatórios para contagem dos neurônios da área.....	38
Figura 13-	Retículo para delimitação da área de contagem.....	39
Figura 14-	Gráficos ilustrativos dos parâmetros de Campo Aberto analisados (machos)..	40
Figura 15-	Gráficos ilustrativos dos parâmetros de Campo Aberto analisados (fêmeas)...	41
Figura 16-	Gráficos ilustrativos dos parâmetros de LCE analisados (machos).....	42
Figura 17-	Gráficos ilustrativos dos parâmetros de LCE analisados (fêmeas).....	43
Figura 18-	Gráficos ilustrando os parâmetros do teste de agressividade analisados (machos).....	44
Figura 19-	Gráficos ilustrando os parâmetros do teste de agressividade analisados (fêmeas).....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Contagem ABL machos.....	45
Gráfico 2-	Contagem ABL fêmeas.....	46
Gráfico 3-	Contagem MePV machos.....	46
Gráfico 4-	Contagem MePV fêmeas.....	47

SUMÁRIO

1	INDRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3	JUSTIFICATIVA.....	28
4	OBJETIVOS.....	29
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	ANIMAIS.....	30
5.2	TRATAMENTO.....	30
5.3	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	32
5.3.1	Avaliação da Atividade Geral no Campo Aberto “Open Field”	32
5.3.2	Avaliação da Ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	33
5.3.3	Avaliação da agressividade – Paradigma Residente-Intruso	35
5.4	COLETA DAS AMOSTRAS.....	36
5.5	PROCESSAMENTO E COLORAÇÃO.....	36
5.6	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS.....	37
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6	RESULTADOS.....	40
6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL NO CAMPO ABERTO.....	40
6.2	AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	42
6.3	AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE	43
6.4	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS.....	44
6.4.1	Densidade neuronal na Amígdala Basolateral em machos.....	44
6.4.2	Densidade neuronal na Amígdala Basolateral em fêmeas.....	45
6.4.3	Densidade neuronal no núcleo póstero-ventral da amígdala medial em machos.....	46
6.4.4	Densidade neuronal no núcleo póstero-ventral da amígdala medial em fêmeas.....	47
7	DISCUSSÃO.....	48
8	CONCLUSÃO.....	58
	REFERENCIAS.....	59
	ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os neurônios são células altamente diferenciadas, organizadas e com funções tão especializadas que tornam a estrutura do sistema nervoso central (SNC) uma das mais complexas do organismo humano. Seu estudo compreende interações entre os diversos sistemas, realizadas por conexões nervosas, neurotransmissores e hormônios. As informações e comunicações entre os neurônios são feitas por intermédio de substâncias químicas produzidas por eles e liberadas nas fendas sinápticas, os chamados neurotransmissores. Várias substâncias desempenham esta função, como acetilcolina, adrenalina, opióides, dopamina, serotonina e mais uma infinidade delas.

O SNC é um dos principais “tecidos-alvo” dos esteróides sexuais, os quais agem tanto por mecanismos genômicos, modulando a síntese, liberação e metabolismo de muitos neuropeptídeos e neurotransmissores, como por meio de mecanismos não-genômicos, influenciando a excitabilidade elétrica, a função sináptica e as características morfológicas dos neurônios (SILVA ; SÁ, 2013).

Os esteroides são hormônios produzidos principalmente pelo córtex da glândula suprarrenal e pelas gônadas, e são responsáveis por diversas funções no organismo, tais como controle metabólico ou de características sexuais. Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) são sintéticos derivados da testosterona, muito utilizados na clínica médica e também no meio esportivo devido às suas propriedades anabólicas maximizadas através da alteração de suas estruturas químicas (HEBERT et al. 1984; KUHN, 2002).

Em doses terapêuticas, os EAAs são utilizados em diversos tratamentos na clínica médica, como por exemplo, no tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos e até na recuperação de cirurgias e atrofias musculares por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos (CELOTTI ; CESI, 1992; CREUTZBERG, et al. 2003; HEBERT et al. 1984).

No meio esportivo, o uso abusivo de EAA é uma prática muito empregada visando melhorar o desempenho físico de atletas e aumentar a massa muscular, porém a sua utilização não é restrita a este meio, sendo também uma prática crescente entre praticantes de atividades físicas, principalmente em academias. Grande parte dos abusos de EAAs ocorre entre fisiculturistas não-competitivos ou não atletas (KAM; YARROW, 2005).

Atualmente, o aumento do comércio destes fármacos (20-30% ao ano) para fins não terapêuticos, tornou-se um problema de saúde pública (EVANS, 2004). Em resposta ao

aumento do consumo destas substâncias, à fabricação clandestina e ao comércio ilegal; em 1991 os EAA foram classificados como substâncias de uso controlado do tipo 3 pelo congresso norte americano (SHAHIDI, 2001; SJÖQVIST et.al. 2008). No Brasil estes fármacos também são substâncias de consumo controladas (KICMAN, 2008).

O uso abusivo de EAA é baseado em doses suprafsiológicas que são de 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas (BROWER, 1993; CLARK; FAST, 1996) 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, dentre outras (BAHRKE et al. 1990; POPE; KATZ, 1988; SCHULTE et al. 1993).

Os efeitos adversos físicos e psicológicos dos EAA permanecem incompletamente documentados, havendo mais comumente envolvimento hepático, endócrino, musculoesquelético, cardiovascular, imunológico, reprodutivo e psicológico, que podem ser divididos em três tipos: efeitos virilizantes, efeitos feminilizantes (mediados pelos metabólitos estrogênicos do esteróide) e efeitos tóxicos, geralmente mediados por mecanismos incertos (THEIN et.al. 1995; WILSON, 1996).

Estudos demonstram que os EAA podem ter atividade deletéria sobre o SNC de humanos, manifestando-se por alterações morfológicas, funcionais e comportamentais. Os andrógenos são reconhecidos como moduladores do comportamento agressivo (BARFIELD et.al. 1972; SVARE, 1990). Sabe-se muito pouco sobre os efeitos dos EAA na ansiedade. De uma maneira geral os poucos estudos que abordaram EAA e ansiedade apresentam resultados controversos (BITRAN et al. 1993; CLARK; HENDERSON, 2003).

Estudos recentes (CLARK et al. 2006; MCINTYRE et al. 2002) estão começando a investigar mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de EAA em roedores. O recente trabalho de Damião et al. (2012), demonstrou a ocorrência de alterações significativas na quantidade de corpos celulares de neurônios no córtex cerebral de animais tratados com esteroides anabolizantes.

Um exame detalhado das redes neurais que regulam os comportamentos associados à ansiedade e à agressividade, revelam a sobreposição de circuitos neurais, dando bases à idéia de que a agressividade e a ansiedade compartilham uma neuroanatomia em comum (DELVILLE et al. 2000; ERNST; FUDGE, 2009; RICCI et al. 2012).

O sistema límbico regula uma série de comportamentos que são essenciais para a sobrevivência de todas as espécies de vertebrados, incluindo os seres humanos. Controla predominantemente, respostas adequadas aos estímulos com relevância social, emocional ou

motivacional, que inclui comportamentos inatos como acasalamento, agressão e defesa. A ativação dos circuitos que regulam esses comportamentos inatos começa no Sistema Nervoso Periférico (SNP) com a estimulação sensorial (principalmente através do sistema olfativo em roedores), e é então processado no cérebro por um conjunto de estruturas que inclui a amígdala e o hipotálamo (SOKOLOWSKI; CORBIN, 2012).

Anatomicamente, o complexo amigdalóide, dentre outras estruturas do sistema límbico, como a área septal e o hipocampo se mostra como a principal rede neural envolvida com esses comportamentos. Dentre as diferentes funções da amígdala de ratos estão respostas a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfatórios e hormonais (como o dos esteróides sexuais e os glicocorticóides), modulação dos comportamentos reprodutivo, maternal, defensivo e agressivo e participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (DAVIS, 2000; DE CASTILHOS et al. 2008; EVERITT, 1995; KLING; BROTHERS, 1992; LeDOUX, 1992; PITKÄNEN, 2000; QUIRK et al. 1995; RASIA-FILHO et al. 2000; SWANSON; PETROVICH, 1998; WOOD; NEWMAN, 1995).

Partindo do exposto, fica evidente que há efeitos neurológicos negativos consideráveis em decorrência do uso abusivo ou crônico de EAAs. Desta forma, estudos com resultados positivos ou negativos sobre alterações neuro-hormonais ou estruturais decorrentes do uso de esteroides anabolizantes, tornam-se essenciais para o melhor entendimento dos efeitos adversos de uma droga em consumo crescente na sociedade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os EAAs referem-se aos hormônios esteróides da classe dos hormônios sexuais masculinos. Estes hormônios são responsáveis por promover e manter as características sexuais específicas masculinas e pela condição anabólica dos tecidos somáticos (MOORADIAN et. al., 1987). O termo *andrógeno* é de origem grega, onde *andro* significa homem e *gennan*, produzir. Compõem esta classe, a testosterona (T) e seus derivados (SHAHIDI, 2001).

A produção da T ocorre principalmente nas células intersticiais dos testículos e, em menor quantidade, nos ovários e glândulas adrenais (KOCHAKIAN, 1993; KOPERA, 1985). A T exerce seus efeitos andrógenos e anabólicos em diversas regiões do corpo, incluindo os tecidos reprodutivos como testículos e ovários. Atua também em tecidos não reprodutivos como músculo esquelético, tecido ósseo, rins, fígado e SNC (BASARIA et.al. 2001; KICMAN, 2008; SHAHIDI, 2001; SNYDER, 1984).

As propriedades androgênicas destes esteróides são responsáveis pelo crescimento e maturação do sistema reprodutor e de características sexuais secundárias masculinas, como o engrossamento da voz e crescimento de pêlos no púbis, axilas e face, além do aumento da libido e das glândulas sebáceas. Já suas propriedades anabólicas são determinadas pela sua capacidade de aumentar a síntese protéica, estimular a fixação de nitrogênio, reter água e de aumentar o número de eritrócitos, levando a alterações somáticas, como o aumento gradual e crescimento da musculatura esquelética e dos ossos e a diminuição de gordura corporal (KOCHAKIAN,1993).

Por possuir estas características, o potencial terapêutico da T foi explorado na clínica; sua molécula sozinha não é eficiente quando injetada ou tomada oralmente, pois é muito susceptível à metabolização (ou inativação) relativamente rápida pelo fígado. Consequentemente, a estrutura química da T teve que ser modificada por meio de variação dos grupos funcionais em diversas regiões na cadeia do esteroide T na tentativa de tornar sua metabolização mais lenta e aumentar sua meia-vida útil e também de dissociar a ação androgênica da ação anabólica (KAM; WEINECK, 2005; YARROW, 2005). Assim, surgiram seus diversos derivados sintéticos, EAAs que mimetizam a ação endógena da T reduzindo os seus efeitos androgênicos e prolongando a sua meia-vida útil. Embora a dissociação completa dos efeitos androgênicos e anabólicos não tenha sido conseguida, alguns EAAs mostraram

significativo aumento da atividade anabólica, com redução da androgenicidade (CELOTTI, 1992; DA SILVA et.al. 2002; SHAHIDI, 2001).

Mais comumente, a molécula de T é alquilada na posição 17α para formar esteróides anabolizantes orais por retardar o catabolismo hepático da molécula, dentre eles encontram-se a metiltestosterona, a metandrostenolona, a nortandrolona, a fluoximesterona, o danazol a oxandrolona e o estanozol. A molécula da testosterona também pode ser esterificada na posição 17β para formar esteróides anabolizantes injetáveis, mais lipofílicos que a testosterona, como o cipionato, propionato, enantato e undecanoato de testosterona. O derivado 17β é suspenso em óleo, o que permite a manutenção da concentração no corpo por várias semanas. Além destas duas formas principais, há também os compostos com o anel esteroide alterado, como a mesterolona, nortestosterona e a metenolona (Figura 1). Mais recentemente, adesivos transdérmicos e *sprays* nasais têm sido utilizados (DA SILVA et.al. 2002; LISE, et. al., 1999; SNYDER, 1984; YESALIS; BHRKE, 1995). Atualmente, mais de 100 derivados sintéticos de EAA já foram desenvolvidos (SHAHIDI, 2001). Dentre os mais utilizados por atletas, segundo Maravelias et.al., 2005, estão o Cipionato de Testosterona (CT) e o Estanozolol (ST).

A figura abaixo representa um modelo estrutural da molécula de testosterona, indicando as posições usuais das modificações para obtenção dos EAAs sintéticos.

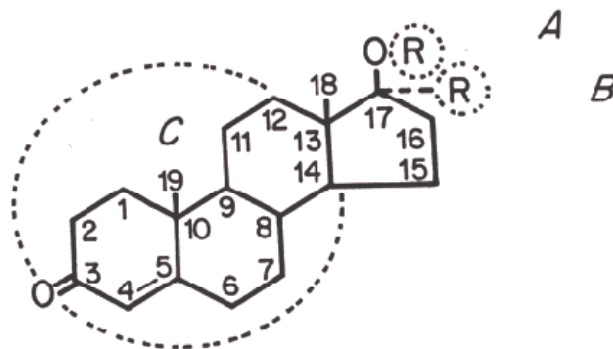


Figura 1- Modelo estrutural da molécula de testosterona, indicando as posições usuais das modificações para obtenção dos EAAs sintéticos.

Nota: A- éster do grupo 17β – hidroxil; B- compostos alquilados na posição 17α ; C- compostos com o anel esteroide alterado.

Fonte: Wilson, 1988.

A testosterona muitas vezes atua apenas após sua metabolização, que pode gerar dois outros esteroides ativos: a di-hidrotestosterona (DHT) e o estradiol. Alguns efeitos parecem ser mediados pela própria testosterona, alguns pela DHT e outros pelo estradiol (SNYDER, 2001). As repostas dos EAA em diferentes órgãos variam conforme as concentrações de receptores e as ações de enzimas específicas locais como a 5- α -redutase e a aromatase (KAM & YARROW, 2005).

A enzima 5- α -redutase catalisa irreversivelmente a conversão da T em DHT. Tanto a T quanto a DHT agem através do mesmo receptor, o receptor de androgênio RA, porém o receptor tem maior afinidade pela DHT que ativa a expressão gênica mais eficientemente. O complexo enzimático aromatase, presente predominantemente no tecido adiposo e fígado, catalisa a conversão da testosterona em estradiol. Esta conversão resulta em aproximadamente 85% do estradiol circulante em homens. O estradiol se liga ao receptor estrogênico RE (SNYDER, 1984). A pesquisa de Dall'Oglio et.al., 2008, demonstrou a ampla distribuição de receptores androgênicos e da enzima 5- α -redutase, a enzima que converte a testosterona em seu metabólito ativo, dihidrotestosterona (DHT) no SNC, inclusive no hipotálamo e complexo amigdalóide de ratos e camundongos machos e fêmeas.

Devido ao caráter lipofílico dos EAA em sua forma livre, na corrente sanguínea eles se difundem diretamente através da membrana plasmática de células-alvo, ligando-se aos receptores de esteroides, formando o complexo hormônio-receptor, através de uma ligação específica, que depende das características químicas de cada esteroide (CELOTTI; CESI, 1992; GOODMAN; GILMAN, 2006). Os andrógenos ligam-se aos receptores androgênicos citoplasmáticos, e tal ligação é acompanhada da interação dos complexos resultantes com sítios nucleares e efeitos genômicos subsequentes, através da transcrição de genes (elaboração de RNA a partir de DNA e síntese de proteínas) ou repressão de genes (inibição da transcrição). Estas ações caracterizam a via denominada “via clássica” de ação dos esteróides (RANG et al. 2008). Os efeitos mais lentos e duradouros são aqueles que alteram a expressão gênica e promovem indução ou repressão de enzimas ou de proteínas receptoras, repostas tróficas e o remodelamento estrutural dos tecidos-alvos desses hormônios (McEWEN, 2006).

Efeitos rápidos, considerados não genômicos, também foram observados para os andrógenos. Num estudo com ratos machos adultos, observou-se que a aplicação de testosterona sobre neurônios individuais, na região do hipotálamo anterior e núcleo septal, resultou em aumento da frequência de disparos segundos após a aplicação, enquanto foi observada a supressão da atividade cerebral em gatos pelos metabólitos da testosterona, androsterona e androstenediol, 1 minuto após injeção endovenosa (BRANN; MAHESH,

1995; KUBLI-GARFIAS et.al. 1982). Estes efeitos são obtidos, então, por outra via de sinalização destes hormônios, denominada “via rápida”, que pode ocorrer independentemente da ligação aos RA e RE citoplasmáticos. O efeito rápido dos hormônios esteroides consiste basicamente na alteração da fluidez da membrana plasmática através de três distintos mecanismos de ação: efeito que ocorre na membrana plasmática independente de ligação a receptor; efeito que ocorre na membrana plasmática através da ligação a receptores que não RA ou RE; efeitos que ocorrem na membrana plasmática decorrentes da ligação aos RA ou RE. Na via rápida, há alteração nas vias de sinalização envolvendo, por exemplo, proteínas como adenilato ciclase, proteína cinase ativada por mitógeno e fosfatidilinositol 3-cinase (FALKENSTEIN et al. 2000; KICMAN, 2008).

Os androgênios são hormônios necessários durante toda a vida dos machos, desde a diferenciação sexual no útero, passando pelo desenvolvimento sexual secundário durante a puberdade, chegando ao estabelecimento e manutenção da função sexual adulta e da fertilidade. Sua ação também pode ser observada em grande número de tecidos-alvo, reprodutivos e não reprodutivos, incluindo osso, tecido adiposo, músculo esquelético, coração, cérebro, próstata, rins e fígado (WU, 1997).

Nas fibras dos músculos estriados, a testosterona exerce efeitos tróficos promovendo hipertrofia das fibras individualmente. Em um sistema de cultura de mioblastos, a testosterona estimulou a atividade mitótica celular. A atuação dos androgênios na gênese da hipertrofia muscular é, aparentemente, uma ação direta do hormônio nas fibras musculares, consequência do aumento da síntese proteica, e não é mediada pelos núcleos espinhais que inervam esses músculos (CELOTTI; CESI, 1992; JOUMAA; LÉOTY, 2001; SHAHIDI, 2001).

Outro importante efeito dos esteróides sexuais masculinos é o estímulo da eritropoese. A administração de andrógenos em vários mamíferos aumentou a contagem de reticulócitos e a atividade eritropoética da medula óssea. Vários estudos em humanos mostraram valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos, maiores em homens do que em mulheres, e anemia em pacientes com hipogonadismo. Além de estimular a produção dessas células, os esteróides sexuais masculinos também aumentam o 2,3-difosfoglicerato, responsável pela ligação do oxigênio à hemoglobina, presente nos eritrócitos (SHAHIDI, 2001).

Além dos efeitos tróficos mediados pela ativação dos receptores de androgênio, recentes estudos demonstram que essas substâncias são antagonistas competitivas para o receptor de glicocorticoides. Como os glicocorticoides são responsáveis pelo catabolismo proteico, a ocupação dos receptores de glicocorticoides pelos esteroides anabolizantes e a

redução da expressão de genes responsivos a corticoides levaria a uma ação anti-catabólica nesse tecido (HICKSON et.al., 1990; ZHAO et.al. 2004).

A proliferação osteoblástica, produção de matriz óssea proteica, e síntese de fatores de crescimento e citocinas estão associadas aos androgênios; todos esses efeitos ocorrem através dos receptores androgênicos nos osteoblastos. O hipogonadismo não tratado em homens adultos está associado à remodelação óssea reduzida, baixos níveis séricos de 1,25-dihidroxicolecalciferol e diminuição de formação óssea, demonstrando a importância desse hormônio para a manutenção da função óssea. (SHAHIDI, 2001).

Por estas propriedades, a T e os EAAs são utilizados em doses terapêuticas no tratamento clínico de doenças como a anemia, o angioedema hereditário, o câncer de mama, depressões e no auxílio terapêutico da cura de feridas e cicatrização (CLARK; HARROLD, 1997; DEMLING; ORGILL, 2000; LISE et al. 1999; STRAWFORD et al. 1999); são também utilizados no tratamento de inúmeras condições associadas à deficiências androgênicas e deficiências anabólicas (CONWAY et al. 2000; FENICHEL et al. 2001). Recentemente, foi relatado o uso de esteróides anabólicos em baixas doses no tratamento de doenças cardiovasculares, tendo efeitos antiaterogênicos e antianginosos (ENGLISH et al. 2000).

Por suas características anabólicas, os EAAs também são muito utilizados com objetivos não terapêuticos, o que ocorre principalmente por fisiculturistas e levantadores de peso que visam o aumento da massa muscular, melhora do desempenho físico e uma maior preservação e restabelecimento da massa muscular esquelética. Esta prática leva ao uso abusivo e ilícito dos EAAs. Nestas condições, os EAAs geralmente são administrados em doses supra-fisiológicas que podem chegar à 500mg/dia em ciclos que duram entre 4-6 meses. As doses e combinações usadas por atletas são de 10-100 vezes maiores que as doses terapêuticas (CLARK; HARROLD, 1997; CUNHA et al. 2004; KARBALAY-DOUST et al. 2007).

Estudos demonstram que o benefício da atividade anabólica dos EAAs em indivíduos saudáveis resultando em hipertrofia muscular, aumento da força muscular e perda de tecido adiposo, ocorre somente quando administrados em superdoses. Poucas semanas após a suspensão do tratamento, a massa e força muscular decaem e, por isso, faz-se necessária a aplicação crônica destas substâncias pelos atletas para manutenção dos efeitos anabólicos desejados (CLARK et al. 1995; GRIVETTI; APPLGATE, 1997; LUKAS, 1996; SJÖQVIST et al. 2008).

Em 1970 o uso exacerbado de EAAs no meio desportivo para melhorias no desempenho físico tornou-se público e em 1974, seu uso foi banido pelo Comitê Internacional

de Jogos Olímpicos (BROOKS; REDDON, 1996; SCHÄNZER, 1996). De acordo com a Agência Mundial de *Antidoping*, estas substâncias químicas são proibidas devido a critérios que incluem o risco à saúde que representam. As drogas ergogênicas são as substâncias predominantemente encontradas em testes de *antidoping* (HANDELSMAN; HEATHER, 2008).

Não é rara a ocorrência de graves problemas de saúde e sociais associados ao uso abusivo de EAA. A maioria dos usuários apresenta efeitos adversos como acne (40%-54%), atrofia testicular (40%-51%) e ginecomastia (10%-34%) (BOLDING et al. 2002). Além disso, podem ocorrer danos ao tecido hepático, hipertensão arterial e hipertrofia ventricular esquerda, além de hipertrofia de clitóris, engrossamento da voz, alterações do ciclo menstrual e aumento dos pêlos da face e do corpo em mulheres (MELLO et al. 2005).

Segundo Corrigan (1996), os efeitos psicológicos vão desde efeitos como a mudança de humor e a euforia, onde existe melhora da confiança, energia e autoestima, com aumento da motivação e do entusiasmo; ocorrendo também a diminuição da fadiga, insônia, aumento da irritação, raiva e agitação, ansiedade e depressão, até a ocorrência de efeitos graves que se manifestam quando sentimentos de agressividade evoluem para comportamentos violentos, hostis e anti-sociais. A presença de transtornos de humor, alterações na libido, e em casos mais graves, até alucinações (psicose) são relatados em indivíduos que utilizam os EAAs (COOPER et al.1996; HALL et al.2005; HARTGENS; KUIPERS, 2004; PARROT et al. 1994; SU et al. 1993; UZYCH, 1992).

Recentes modelos animais demonstraram que o uso crônico e o abuso do EAA Estanozolol (ST), reduziram os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e dopamina no hipocampo e córtex pré-frontal de roedores. Além da redução na expressão dos receptores de glicocorticoides 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).

Uma preocupação em particular surgiu pela sugestão de que os EAAs podem causar dependência física ou psicológica. Em estudos comportamentais com ratos e hamsters, estes mostraram um condicionamento operante positivo para a autoadministração de EAAs (DIMEO; WOOD, 2006; WOOD, 2004). Os efeitos reforçadores para a autoadministração foram prevenidos pela administração de antagonistas para receptores de naltrexona ou dopamina, sugerindo o envolvimento de mecanismos opioides e dopaminérgicos (PETERS & WOOD, 2005; WOOD, 2004).

De acordo com Kalinine et.al. (2014), estudos demonstram que os EAA podem ter atividade deletéria sobre o SNC. Os poucos dados obtidos *in vitro* sugerem que a influência dos andrógenos na neurodegeneração depende criticamente do regime de tratamento, da concentração e do fenótipo da célula. Uma única aplicação de testosterona em concentração suprafisiológica, promoveu a morte celular por apoptose em células nervosas por alterar a sinalização de Ca²⁺ na mesma (ESTRADA et. al. 2006).

Em contraste, hormônios esteroidais também estão envolvidos em processos de plasticidade neuronal, que ocorrem no giro dentado durante toda a vida de mamíferos (CAMERON; GOULD, 1996), além disso, a DHT exerce papel fundamental na neurogênese hipocampal adulta (OKAMOTO, 2012). Sua propriedade neuroprotetora também tem sido demonstrada por GALEA (2006).

Até relativamente pouco tempo atrás, pensava-se que os seres humanos eram a única espécie que possuía emoção. Inicialmente documentada por Papez (1937), a cognição social ocorre por meio de uma complexa rede neural de estruturas interligadas que inclui áreas na região ventromedial dos lobos temporais e frontal e suas conexões com o hipotálamo e o tronco encefálico. Esta rede neuronal, denominada por "sistema límbico" é localizada em torno da amígdala, uma pequena estrutura em forma de amêndoa situada no fundo do lobo temporal (Figura-2). A significância emocional, produzida na amígdala é geralmente considerada a força motriz por trás de comportamentos humanos inatos, tipicamente sociais na natureza (AGGLETON, 2000; BARBAS, 1995; BROTHERS, 1989; LeDOUX, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de síntese cerebral de esteroides neuroativos (McCAULEY et al. 1992; SANNE; KRUEGER, 1995), havendo portanto, duas origens para os esteroides encontrados no cérebro: periférica e central (neuroesteroides). A produção central de hormônios fornece níveis mais elevados no sítio de ação cerebral, quando comparada aos níveis hormonais alcançados pela produção periférica. Assim, a ação dos esteroides pode ser mais eficaz com sua produção central (SILVA; SÁ, 2013).

À medida que a comunidade científica aceitou as emoções como o medo, ansiedade, recompensa e atração como resultado de uma circuitaria neuronal em seres humanos, outras espécies, inclusive os roedores, foram gradualmente aceitos como possuindo circuitos semelhantes e, portanto, emoções semelhantes. Uma vez que a percepção de que as emoções não são exclusivamente humanas, a compreensão dos circuitos neurais envolvidos no processamento de emoções e outras situações sociais têm avançado rapidamente, o que ocorre através da utilização de modelos experimentais de roedores. Em modelos de roedores, os

estados emocionais (por exemplo, medo, ansiedade e receptividade social) são geralmente quantificados pela análise de seus comportamentos (SOKOLOWSKI; CORBIN, 2012).

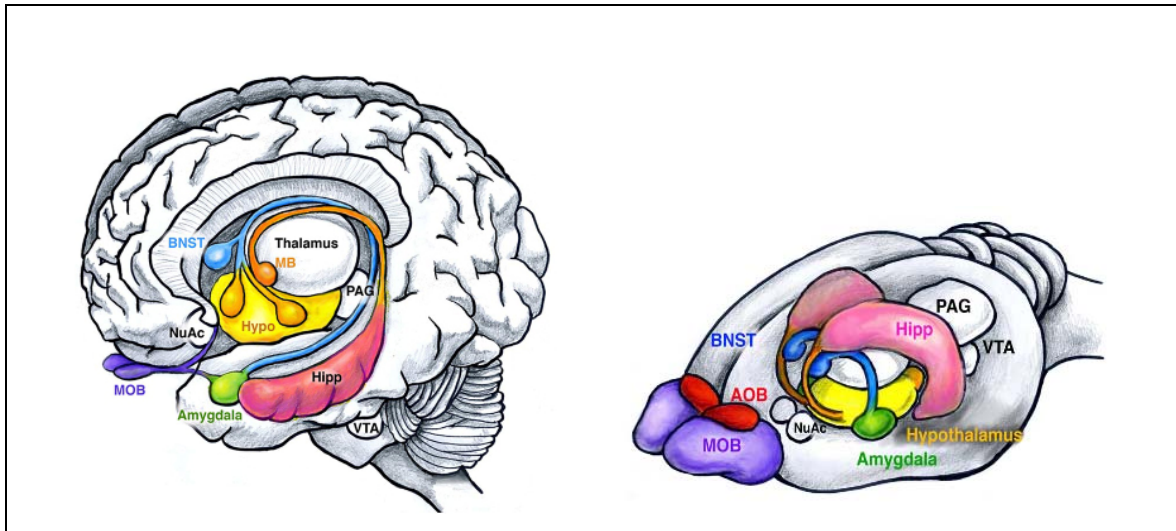


Figura 2- Estrutura básica do sistema límbico humano e de roedores.

Nota: À esquerda, cérebro humano mostrando amígdala (verde), núcleo leito da estria terminal (BNST) (azul), Hipotálamo (amarelo) e hipocampo (rosa). O hipocampo se unindo aos corpos mamilares (laranja) através do fórnix. Informações olfatórias são trazidas pelos bulbos olfatórios (roxo). Núcleo accubens (NuAc), Área tegmental ventral (VTA) e substância cinzenta periaquedutal (PAG). À direita, estruturas similares dos roedores: núcleo olfatório acessório (vermelho). Juntas, estas estruturas facilitam a execução e o reforço de comportamentos emocionais inatos.

Fonte: Sakolowski; Corbin, 2012.

Estudos atuais têm revelado que hormônios androgênicos podem ser sintetizados no hipocampo (HOJO et.al. 2009, KONKLE; MCCARTHY, 2011), e esta síntese local pode ser sustentada pelo fato de a enzima 5- α -redutase ter sido detectada no giro denteado do hipocampo (MELCANGI et.al. 1993). A distribuição da 5-a-redutase no cérebro não é homogênea, pois é encontrada em maior concentração no hipotálamo e mesencéfalo que em outras áreas do cérebro (corpo amigdalóide, hipocampo, cerebelo e córtex cerebral) (MELCANGI et. al. 1990).

O hipocampo tem sido apontado como o maior alvo de ação dos hormônios andrógenos (HATANAKA et.al. 2009; KERR et.al. 1995; MACLUSKY et. al. 2006). A T e a DHT exercem papéis neuroprotetores através de receptores androgênicos (ARs) no hipocampo (MACLUSKY et. al. 2006; SPRITZER; GALEA, 2007) e a T pode ser convertida também em estradiol via aromatase no cérebro (HOJO et.al. 2009, KRETZ et.al. 2004). O trabalho de Kimoto (2001), demonstrou que a síntese hipocampal de esteroides é facilitada via receptores NMDA.

Estudos realizados em primatas utilizando-se andrógenos marcados, localizaram-se receptores andrógenos no hipotálamo, amígdala, corpo septal e hipocampo (BLOOM, 1988), as quais são áreas do sistema límbico e, portanto, ligadas a reações emocionais, do comportamento, aprendizado e regulação endócrina. Sarrieau et al. (1990) estudaram amostras de tecido do lobo temporal (removidas cirurgicamente) de cinco homens epiléticos e, usando técnicas de imuno-histoquímica, conseguiram identificar receptores androgênicos nessa área cerebral, sugerindo que possam estar envolvidos em atividades cognitivas em adultos.

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 para o ácido gama-aminobutírico (GABA) GABAA em áreas cerebrais anteriores sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico.

Considerando que o sistema monoaminérgico regula a agressividade, o comportamento sexual, o medo e a ansiedade; pode-se sugerir uma possível correlação entre alterações das monoaminas geradas pelos esteroides anabolizantes e as alterações comportamentais e os distúrbios do humor (HENDERSON et al. 2006; TUCCI et al. 2012).

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos (PRYBYLOWSKI; WENTHOLD, 2004) sendo dominante nas áreas hipotalâmica e límbica (AMARAL; WITTER, 1995; BRANN; MAHESH, 1995) e exercendo um papel crucial em mecanismos que fazem parte da base fisiológica de processos comportamentais. As interações entre o sistema glutamatérgico e esteroides gonadais são críticas na regulação das funções hipotalâmicas (BRANN; MAHESH, 1995; DIANO et al. 1997), pois algumas evidências recentes indicam que os EAA podem alterar aspectos morfológicos e neuroquímicos de sinapses glutamatérgicas no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral e, com isso, ter implicações comportamentais importantes (LE GREVES et al. 1997; ROSSBACH et al. 2007).

Os andrógenos são reconhecidos como moduladores do comportamento agressivo (BARFIEDS et al. 1972; BUSCH; WALLEN, 1972; SVARE, 1990). Diversos estudos em animais e humanos, trouxeram evidências indicadoras de que a T facilita o comportamento agressivo (DABBS; MORRIS, 1990; HARDING, 1983; OLWELS, 1987; PERSKY et al. 1971; SCERBO; KOLKO, 1994). Em modelos experimentais com roedores, o comportamento agressivo associado ao uso do EAA é de caráter contraditório, pois a análise dos resultados é afetada por diversas variáveis, como a classe, a combinação ou não de classes

de EAA, dose, gênero, tempo de tratamento, idade dos animais e a metodologia empregada para avaliar o comportamento agressivo (CLARK; HENDERSON 2003; MCGINNIS, 2004).

Os efeitos dos EAA sobre a ansiedade ainda não estão bem esclarecidos, já que tanto respostas ansiogênicas quanto ansiolíticas foram relatadas em animais de laboratório (MINKIN et al. 1993, ROJAZ-ORTIZ et al. 2006). O primeiro estudo sobre os efeitos dos EAAs na ansiedade foi realizado por Bitran et al. (1993), o qual demonstrou que altas doses de propionato de T alteraram o comportamento de ratos Long–Evans no aparato de labirinto em cruz elevado. Porém com 14 dias de tratamento, os animais tratados com o propionato T não foram diferentes do grupo controle. Estes resultados indicam um caráter ansiolítico transitório do tratamento com o propionato de T. O tratamento com Decanoato de Nandrolona em ratos apresentou tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos (BITRAN et al.1993; CLARK; HENDERSON, 2003). Um dos mecanismos de ação que poderiam estar envolvidos no aumento dos níveis de ansiedade induzido pelo decanoato de nandrolona (DN) poderia ser sua ação no núcleo central da amígdala. Em cobaias, foi observado que o tratamento com o EAA nandrolona, aumentou a expressão da proteína C-Fos nesta região (JOHANSONN-STEENSLAND et al. 2002), a qual está relacionada com o controle da ansiedade, e também de comportamentos agressivos (SIEGEL et al. 1999).

Relatos recentes têm mostrado uma relação neurobiológica entre o comportamento agressivo e a ansiedade (APTER et al. 1990; FEHON et al. 2001; GUILLOT; CHAPOUTHIER, 1996; VEENEMA; NEUMANN, 2007; VEENEMA et al. 2007). Um exame mais detalhado das redes neurais que regulam esses comportamentos, revela a sobreposição de circuitos neurais, dando bases à ideia de que a agressividade e a ansiedade compartilham uma neuroanatomia em comum (DELVILLE et al. 2000; ERNST; FUDGE, 2009; RICCI et al. 2012).

A amígdala basolateral, medial, central e o hipotálamo constituem áreas relevantes para a regulação do estresse, do medo (DAVIS; SHI, 1999; HERMAN et al. 2005; WALKER et al. 2003) e/ou da agressão territorial (DELVILLE et al. 2000; HALASZ et al. 2002, SIEGEL et al. 1999; VOCHTELOO; KOOLHAAS, 1987).

As relações entre a amígdala e o hipotálamo estão intimamente ligadas às sensações de medo, ansiedade e raiva. A amígdala é responsável pela detecção, geração e manutenção das emoções relacionadas ao medo, e coordenação de respostas apropriadas à ameaça e ao perigo (DE GELDER et al. 2004, HOISTAD; BARBAS, 2008). Ela exerce ligação essencial entre as áreas do córtex cerebral, recebendo informações de todos os sistemas sensoriais. Estas, por sua vez, projetam-se de forma específica aos núcleos amigdalianos, permitindo a integração

da informação proveniente das diversas áreas cerebrais, através de conexões excitatórias e inibitórias a partir de vias corticais e subcorticais (WILLIAMS et al. 2006). Os núcleos basolaterais são as principais portas de entrada da amígdala, recebendo informações sensoriais e auditivas; já a via amigdalofugal ventral e a estria terminal estabelecem conexão com o hipotálamo, permitindo o desencadeamento da ansiedade (BEAR et al. 2002), (Figura-3).

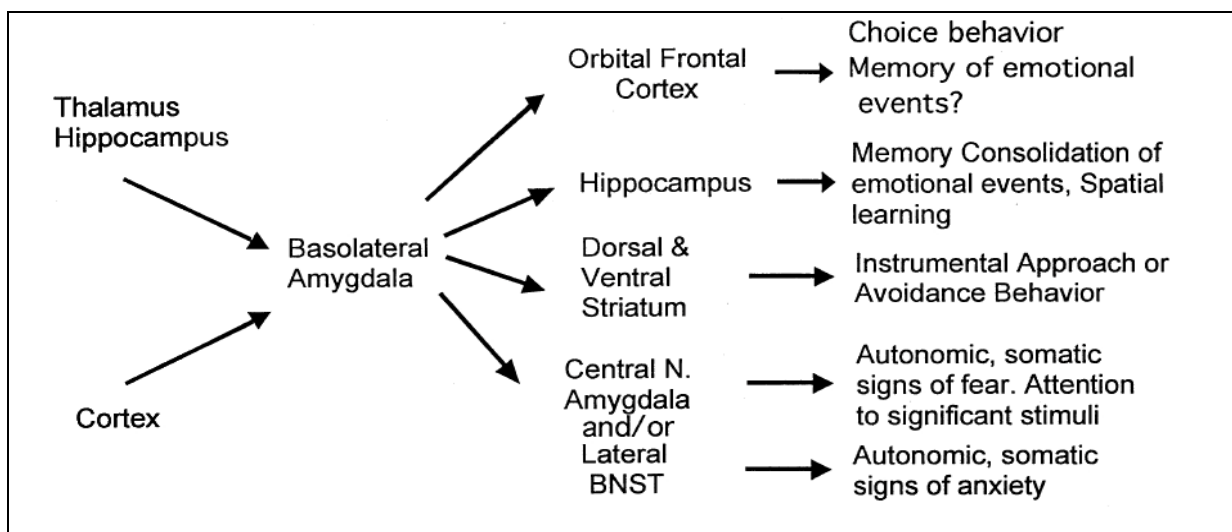


Figura 3- Vias eferentes da ABL.

Nota: Diagrama esquemático de vias eferentes da ABL para várias áreas-alvo e como estas conexões podem estar envolvidas no medo e ansiedade.

Fonte: DAVIS, 1999.

As conexões entre a ABL e a Amígdala Central ou BNST, estão criticamente envolvidas em várias respostas autonômicas e motoras observadas durante estados de medo e ansiedade. Entretanto, há o caso de conexões entre o núcleo basolateral e outras áreas-alvo estarem envolvidas no comportamento emocional (DAVIS, 1999).

Muitos estudos indicam que na ABL a infusão local de GABA ou antagonistas gabaérgicos, benzodiazepínicos, antagonistas de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), agonistas opióides, neuropeptídeo Y, antagonistas dopaminérgicos ou antagonistas glutamatérgicos, levam a diminuição de respostas de medo e ansiedade em diversas espécies animais. Contrariamente, infusões locais de antagonistas gabaérgicos, CRH, vasopressina, hormônio liberador de tirotropina, antagonistas opióides, colecistocinina (CCK) ou análogos, tendem a levar a efeitos ansiogênicos (DAVIS, 1999).

Entre as espécies, diversas regiões cerebrais têm demonstrado um papel no controle da agressão. Em hamsters, o hipotálamo anterior (AHA) e amígdala medial (MeA), dentre outras regiões, regulam a agressividade (DELVILLE et al. 2000). A figura abaixo representa de forma esquemática as vias neuroanatômicas relacionadas à agressividade (Figura-4).

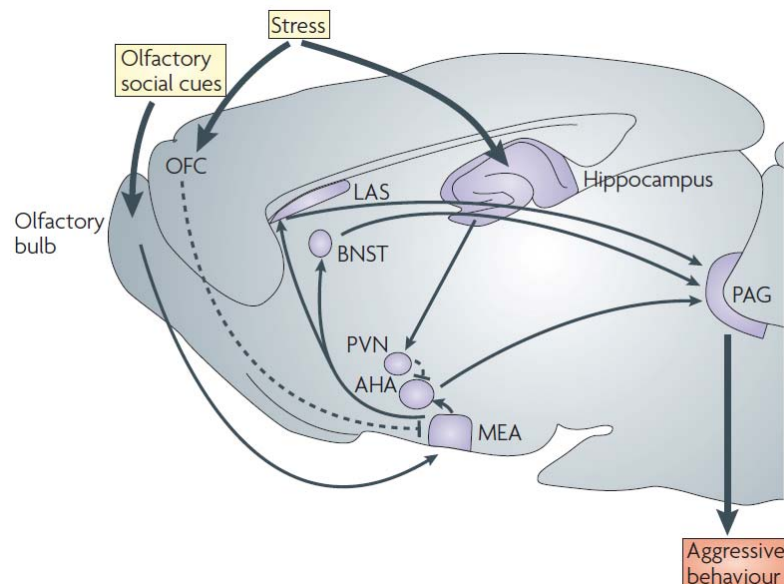


Figura 4-Vias neuroanatômicas da agressividade em roedores.

Nota: Em roedores, a informação do bulbo olfatório é processada pela amígdala medial (MeA) e enviada ao septo lateral (LAS), ao núcleo leito da estria terminal (BNST) e à área hipotalâmica anterior (AHA). Estas áreas cerebrais estão envolvidas com a estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na promoção de comportamentos agressivos específicos para cada espécie. O estresse pode inibir a agressividade através de aferências inibitórias do córtex orbitofrontal (OFC), do hipocampo e do núcleo paraventricular (PVN).

Fonte: Figura adaptada de NELSON; TRAINOR (2007).

A atividade desta rede é regulada (ao menos parcialmente) por sinais neuroquímicos da vasopressina e serotonina (FERRIS et al.1999). No hipotálamo anterior, a vasopressina facilita a agressividade, a qual normalmente é inibida pela serotonina. O neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (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 (CLEMENT et al. 1987; HAUG et al.1984; POTE GAL et al. 1982) e facilitado (STORK et al. 2000; WEERTS et al. 1993) o comportamento agressivo.

Finalmente, vale lembrar que a amígdala, não é nem uma unidade morfológica nem funcional no encéfalo de ratos (SWANSON; PETROVICH, 1998). Por isso é muito

importante estudar de forma individual e detalhada cada um de seus componentes e, por vezes, de seus subcomponentes, os quais formam circuitos específicos para gênese e modulação de respostas neurais envolvidas com comportamentos e ajustes diversos (CAVALCANTE et al. 2006; RONDINI et al. 2004).

Há atualmente, considerável debate sobre sua subdivisão em núcleos, em várias espécies animais e por isso são comuns referências ao núcleo inteiro como complexo amigdaliano. Em ratos, apesar dos limites anatômicos precisos e a classificação de suas subdivisões permanecerem ainda controversos (SWANSON; PETROVICH, 1998), há certo consenso em aceitar que, de acordo com suas características citoarquitetônicas, imunoistoquímicas e hodológicas, a amígdala seja dividida em quatro regiões principais: 1) amígdala “expandida”, denominada assim porque se estende além de seus limites anatômicos e que é formada pelos núcleos medial (MeA) e central (ACe) da amígdala. O MeA, por exemplo, compartilha alguns aspectos estruturais com as partes anterior, ventral e posterior do núcleo intersticial da estria terminal (BNST), BNST intra-amigdaliano, divisão medial supracapsular do BNST e divisão sublenticular da amígdala “expandida” (ALHEID et al. 1995); 2) amígdala com características corticais, subdividida em porção basilar lateral (AMBL) e em porções que se ligam às vias olfatórias e vomeronasal; 3) áreas de transição, localizadas entre a porção ventral dos núcleos da base e a amígdala “expandida”; e 4) núcleos ainda não classificados, constituídos por um grande grupo de células dispersas na substância branca e no interior do BNST (ALHEID et al., 1995; SWANSON; PETROVICH, 1998).

Na primeira região citada (amígdala “expandida”) situa-se a amígdala medial (MeA), a qual divide-se em quatro subnúcleos: núcleo medial ântero-dorsal (MeAD), núcleo medial ântero-ventral (MeAV), núcleo medial pósterodorsal (MePD) e núcleo medial póstero-ventral (MePV) (ALHEID et al. 1995). Na segunda região, encontra-se a amígdala basolateral (ABL). A ABL e o MePV, são as áreas analisadas no presente estudo.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da publicidade adversa, estimativas reportam mais de meio milhão de adolescentes que fazem uso frequente de EAAs nos EUA. De acordo com (IRIART; ANDRADE, 2002), ainda são escassos os estudos que abordam o uso de anabolizantes no Brasil.

Levantamentos feitos pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), realizados no ano de 2005 em 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, 0,9% da população (456.000) já utilizou esteroides anabolizantes alguma vez na vida. O consumidor preferencial no Brasil é representado por homens entre 17 e 34 anos, e o uso, comparado com a última estimativa realizada em 2001, obteve um aumento de 206% (AMBAR, 2009).

Considerando que o uso abusivo dos EAAs pode levar a sérias complicações e danos tanto físicos como psicológicos e comportamentais, e também o pouco conhecimento dos mecanismos neurais envolvidos na vasta gama de “efeitos colaterais” que podem envolver o sistema nervoso central, torna-se necessária a realização de novas pesquisas na busca pela elucidação dos mecanismos cerebrais a eles subjacentes.

4 OBJETIVOS

Analisar as possíveis alterações quantitativas (morfométricas) do número de perfis celulares de neurônios da Amígdala Basolateral e do subnúcleo Pósterio-Ventral da Amígdala Medial, em camundongos sob o uso crônico dos anabolizantes Deposteron® (Cipionato de Testosterona) (CT) e Winstrol Depot® (estanozolol) (ST). Além disso, observar possíveis alterações comportamentais referentes à atividade motora espontânea, ansiedade, e agressividade de camundongos machos e fêmeas, comparando os grupos experimentais com os grupos controles.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item, apresentam-se o material utilizado e os procedimentos realizados no desenvolvimento da pesquisa.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 92 camundongos da linhagem Swiss, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG, sendo 46 machos e 46 fêmeas, com idade aproximada de 90 dias (jovens-adultos) adultos-jovens com peso corpóreo entre 40 e 50 gramas. Destes animais, 30 machos e 30 fêmeas compuseram os grupos experimentais e o grupo controle, e 16 machos e 16 fêmeas, foram utilizados como “iscas” no teste de comportamento agressivo. Os animais dos grupos experimentais e controle foram alojados em caixas individualmente, os animais “iscas” foram armazenados em 2 grupos de 8 animais para cada sexo. Todos os animais foram tratados com ração comercial e água “ad libitum” e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro. Por motivos didáticos, os animais foram separados em grupos:

Grupo Deposteron: Animais que receberam deposteron® (Cipionato de Testosterona).

Grupo Winstrol: Animais que receberam Winstrol Depot® (Estanozolol).

Grupo controle: Animais que receberam solução salina estéril a 0,9%.

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 505/2013, conforme anexo I.

5.2 TRATAMENTO

O tratamento consistiu na aplicação intraperitoneal (i.p.) de dois EAAs, o Deposteron® (CT) e o Winstrol® (ST) nos seus respectivos grupos experimentais, e solução salina a 0,9% estéril no grupo controle, conforme mostrado na Figura-5.

Tanto os grupos experimentais quanto o grupo controle, foram tratados durante 33 dias, com aplicações realizadas duas vezes por semana (nas segundas e quintas-feiras).

Grupos	Número de Animais	EAA	Dosagem
Grupo Deposteron	10 machos 10 fêmeas	Deposteron® ↓ (Cipionato de Testosterona)	0,8mg/kg /dia
Grupo Winstrol	10 machos 10 fêmeas	Winstrol Depot® ↓ (Stanozolol)	1,8mg/kg /dia
Grupo Controle	10 machos 10 fêmeas	solução salina 0,9%	0,05mL /dia

Figura-5 Grupos de animais de acordo com esteroide e a dosagem utilizada.

Fonte: Do autor.

Após receberem as doses baseadas em Inamdar Doddamani e Jayamma (2012) e Aboudkhal et al (1991), nas terças e sextas-feiras, os animais foram submetidos à natação por um período inicial de 5 minutos, aumentado gradualmente, até 15 minutos. A natação era realizada em um recipiente medindo 43x34x26cm (Figura-6), contendo no seu interior água na temperatura de 24-26°C até a borda. O treino de natação foi realizado na tentativa de gerar as mesmas condições de estresse que a musculação. Tanto a administração das substâncias, quanto o treinamento foram realizados sempre no mesmo período do dia.



Figura 6- Recipiente utilizado para a natação dos animais.

5.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

À partir do 33º dia de tratamento, uma bateria de 3 testes comportamentais foi realizada. No dia 33, foi realizado o teste de Campo Aberto. No dia 34, o teste do Labirinto em Cruz Elevado, e nos dias 35 e 36, foi realizado o teste de agressividade, paradigma Intruso-Residente. Para este último teste, os animais foram divididos em dois grupos contendo amostras iguais de animais de cada grupo experimental. Um grupo foi submetido ao teste no dia 35 e o outro, no dia 36. Os animais “iscas” foram repetidos no dia seguinte, uma única vez.

Os experimentos de campo aberto e labirinto em cruz elevado foram realizados durante o período de 13:30 e 16:30 e o de agressividade foi realizado durante o período de 13:00 e 18:00.

A ordem escolhida para a bateria de testes pretendeu seguir uma ordem crescente de aversividade para minimizar interferências nos testes posteriores. As análises foram feitas de maneira cega para as condições experimentais.

Os animais do grupo controle foram intercalados aos animais experimentais para a realização dos testes, lembrando que após cada teste e antes de colocar um novo animal no aparato experimental, o mesmo foi limpo com álcool 10% a fim de homogeneizar a situação experimental, eliminando possíveis odores deixados pelo animal anterior nos aparatos. Após os testes, os animais foram recolocados em suas caixas moradia até o dia seguinte, quando submetidos ao teste seguinte. No dia seguinte ao teste de agressividade, os animais foram eutanasiados com Halotano.

5.3.1 Avaliação da Atividade Geral no Campo Aberto “Open Field”

Servindo como base para controle dos possíveis efeitos dos EAAs sobre a atividade geral dos animais, foram realizados testes de campo aberto para avaliação da atividade motora.

O teste de campo aberto (“open field”) permite a quantificação da atividade motora espontânea. Além disso, a avaliação do efeito anti-tigmotático mostra a diminuição da preferência típica (WALSH & CUMMINS, 1976). O Campo aberto consiste em um aparato experimental de acrílico, na forma de uma arena circular de 30 cm de diâmetro (Figura 7), 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.

Parâmetros avaliados:

- a) Total de cruzamentos, determinado pela contagem dos quadrantes nos quais o animal esteve com as quatro patas (internos e externos);
- b) Cruzamentos nos quadrantes adjacentes às paredes da arena (externos);
- c) Cruzamentos nos quadrantes centrais (internos);
- d) Efeito anti-tigmotático (razão entre o número de cruzamentos centrais sobre o número total de cruzamentos).



Figura 7- Campo aberto (Insight®), utilizado para avaliação da atividade motora espontânea.

Fonte: Do autor).

5.3.2 Avaliação da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um método bem conhecido para avaliação de parâmetros de ansiedade em roedores. Este teste é realizado em um aparato

construído à partir do descrito por Lister em 1987. Possui 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 8). Os animais são então colocados no centro, de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. São então registradas e mensuradas a frequência com que ocorrem os comportamentos de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. De acordo com Carobrez & Bertoglio (2005) e Lister (1987), um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento ansiolítico.

Parâmetros avaliados:

- a) Número de entradas com as quatro patas nos braços abertos;
- b) Número de entradas com as quatro patas nos braços fechados;
- c) Tempo de permanência nos braços abertos (%);
- d) Tempo de permanência nos braços fechados (%).



Figura 8- Labirinto em Cruz Elevado (Insight®) utilizado para os testes comportamentais referentes aos parâmetros de ansiedade.

Fonte: Do autor

5.3.3 Avaliação da agressividade - Paradigma Residente-Intruso.

Neste paradigma o teste foi realizado conforme se segue: Os animais a serem testados (residentes) foram isolados em suas gaiolas no início do tratamento. Por um período de 3 dias que precede o teste, suas gaiolas não foram limpas a fim de manter a marcação territorial do residente pelo cheiro de sua urina. Um camundongo do mesmo sexo e idade, não relacionado ao tratamento e mantido agrupado em gaiolas e, portanto, não agressivo, foi então colocado na gaiola do residente. Este *intruso* serviu como estímulo em um pareamento de 15 minutos (Figura 9). Cada intruso foi utilizado uma única vez por dia de experimento. Os confrontos foram gravados e, posteriormente, analisados de acordo com os parâmetros baseados em Nelson & Chiavegatto (2000).



Figura 9- Aparato utilizado para a realização do teste de agressividade.

Fonte: Do autor.

Parâmetros quantificados:

- a) Tempo de latência para o primeiro ataque;
- b) Número total de ataques.

5.4 COLETA DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia dos animais pela inalação de halotano e a identificação de cada animal, iniciamos então o seguinte procedimento: As cabeças foram abertas e os encéfalos retirados inteiramente. Os encéfalos foram então armazenados em recipientes de vidro contendo formaldeído a 4% pH 7,4 0,1M. Eles permaneceram imersos nesta solução fixadora por 24 horas. Em cada encéfalo foram retiradas amostras em cortes frontais, seriadas e homotípicas (BROWN; AGGLETON, 2001) para que pudéssemos avaliar as áreas então estabelecidas para este estudo (PAXINOS; FRANKLIN, 2012; VAN STRIEN et al. 2009) (Figura 10).



Figura 10: Corte frontal de um cérebro de camundongo próximo as 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 seqüência 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 celulares 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 dos corpos celulares de neurônios foi utilizada a metodologia de contagem aleatória simples (WEST, 1993; MANDARIN-DE-LACERDA, 1994; MANDARIN-DE-LACERDA, 2003; PAKKENBERG e GUNDERSEN, 1995). Neste método foram adquiridos 3 campos microscópicos aleatórios de 3 cortes semi seriados da área, totalizando assim nove (9) áreas analisadas para cada ABL (Figura 11) e adquiridos 2 campos microscópicos aleatórios de 3 cortes semi seriados do núcleo MePV (Figura 12), totalizando assim seis (6) áreas analisadas para cada MePV. 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 13). Desta forma, aferimos o número de células por área contada, e não o número total dessas células nas áreas estipuladas.

Esta 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.

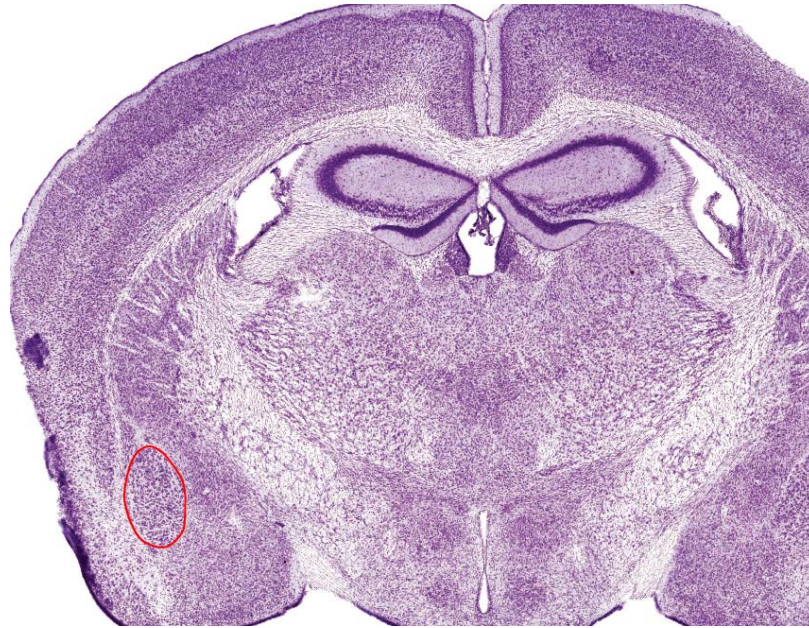


Figura 11- Delimitação de uma ABL e de onde foram estabelecidos os campos microscópicos aleatórios para contagem dos neurônios da área.

Fonte: Imagem modificada de Paxinos & Franklin, 2012



Figura 12- Delimitação de um núcleo MePV e de onde foram estabelecidos os campos microscópicos aleatórios para contagem dos neurônios da área.

Fonte: Imagem modificada de Paxinos & Franklin, 2012

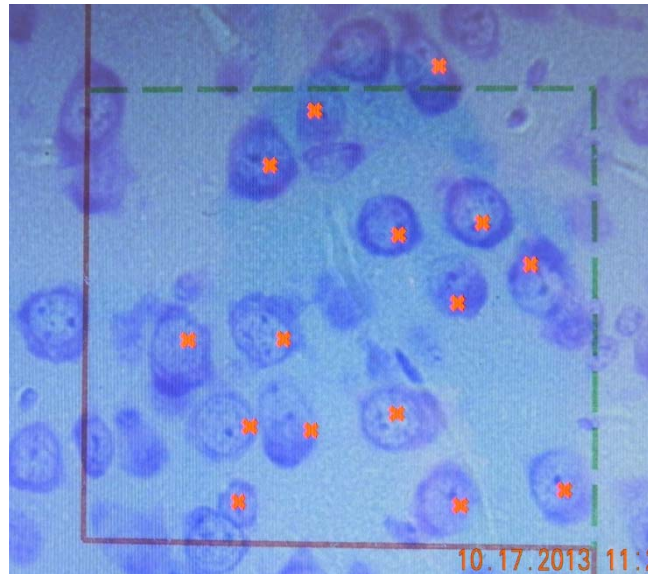


Figura 13: Retículo para delimitação da área de contagem. Imagem representativa do retículo desenhado em transparência e fixado no monitor do computador para quantificação de neurônios inseridos somente dentro do quadrante, excluindo neurônios nas linhas contínuas (vermelho) do retículo.

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

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

Através das devidas análises dos testes comportamentais e das estruturas anatômicas, foram observados os resultados que se seguem.

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL NO CAMPO ABERTO.

Os efeitos da administração crônica dos EAAs no teste do campo aberto, nos machos, são mostrados na fig. 14. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no número de cruzamentos no centro (fig. 14A), cruzamentos na periferia (fig.14B), número total de cruzamentos (fig. 14C) e na razão entre os cruzamentos no centro sobre total de cruzamentos (fig. 14D), entre os animais que receberam os EAAs quando comparados aos animais controle. O teste não demonstrou, portanto, alterações nos parâmetros de atividade geral dos animais tratados com EAAs.

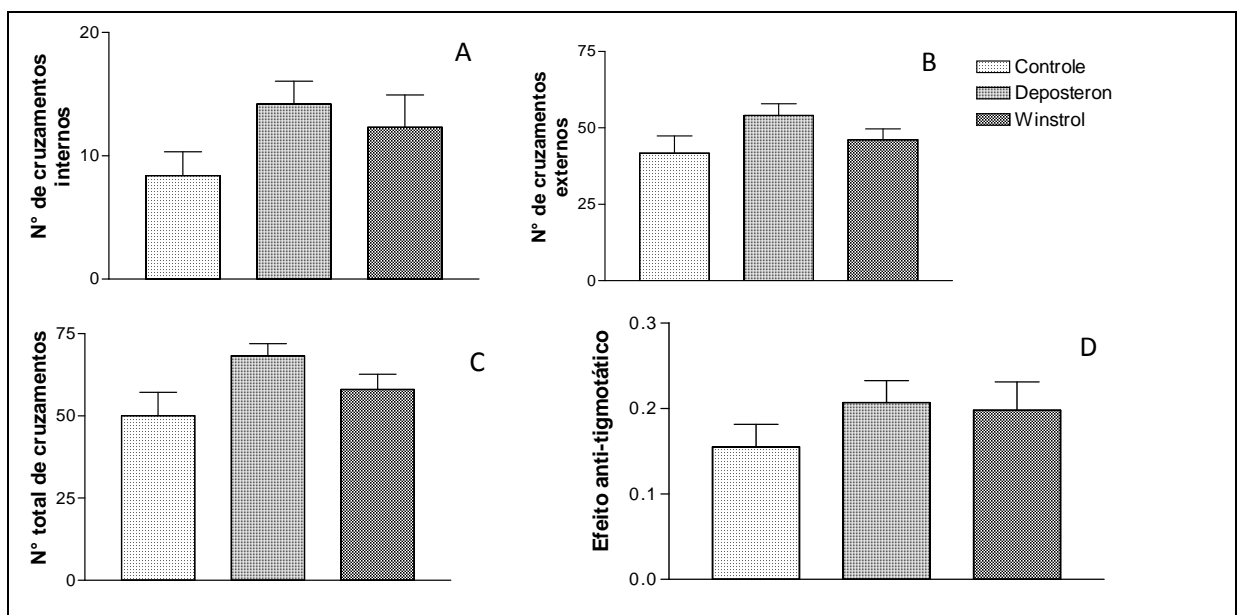


Figura 14- Gráficos ilustrativos dos parâmetros de Campo Aberto analisados (machos).

Nota: Efeito da administração do Deposteron® (CP), do Winstrol Depot® (ST) ou salina sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (efeito anti-tigmotático) (D) em camundongos machos

no campo aberto. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; pós-teste de Tukey em relação ao grupo controle (Salina).

Fonte: Do Autor.

Os efeitos da administração crônica dos EAAs no teste do campo aberto, nas fêmeas, são mostrados na fig. 15. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de cruzamentos no centro (fig. 15A), cruzamentos na periferia (fig. 15B), número total de cruzamentos (fig. 15C) e na razão entre os cruzamentos no centro sobre total de cruzamentos (fig. 15D), entre os animais que receberam os EAAs quando comparados aos animais controle. O teste não demonstrou, portanto, alterações nos parâmetros de atividade geral dos animais tratados com EAAs.

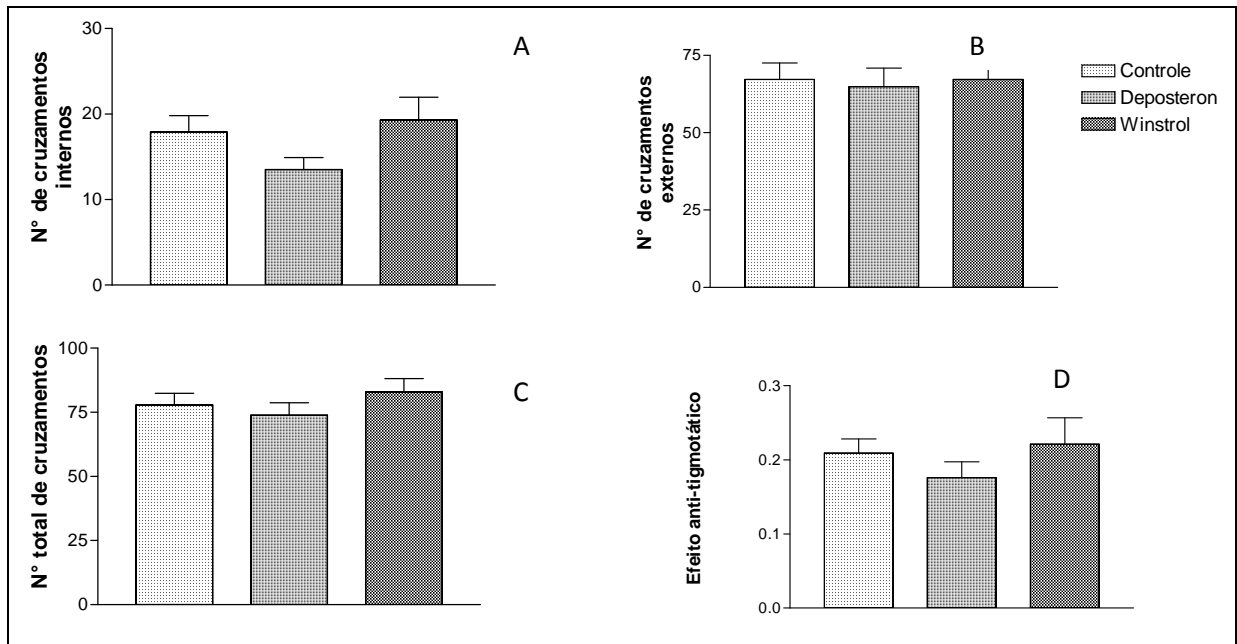


Figura 15- Gráficos ilustrativos dos parâmetros de Campo Aberto analisados (fêmeas).

Nota: Efeito da administração do Deposteron® (CP), do Winstrol Depot® (ST) ou salina sobre o número de entradas na periferia (A), número de entradas no centro (B), número total de entradas (C) e razão de entradas no centro sobre o total de entradas (efeito anti-tigotático) (D) em camundongos fêmeas, no campo aberto. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões; pós-teste de Tukey em relação ao grupo controle (Salina).

Fonte: Do Autor.

6.2 AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).

Os efeitos da administração crônica dos EAAs no teste do LCE, nos machos, são mostrados nos gráficos da fig. 16. Foi observado um menor número de entradas nos braços abertos e um menor tempo de permanência nos mesmos no grupo Winstrol® em relação ao grupo controle. Estes dados indicam uma maior resposta ansiogênica dos animais machos do grupo Winstrol em relação ao grupo controle.

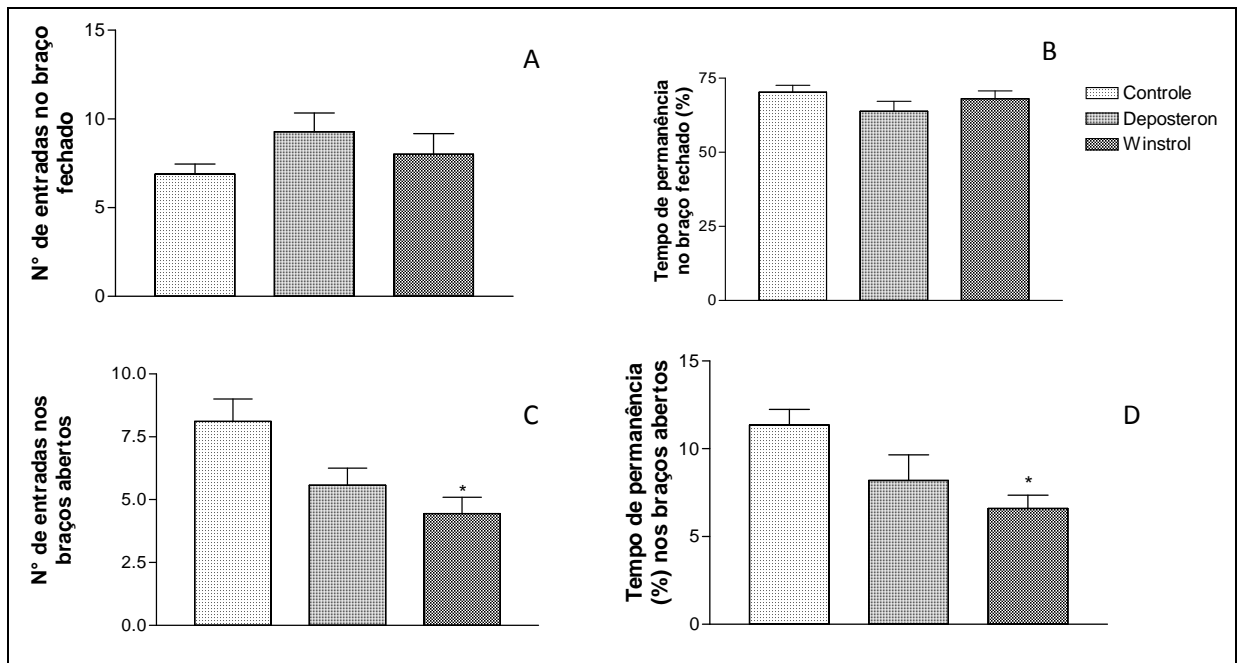


Figura 16- Gráficos ilustrativos dos parâmetros de LCE analisados (machos).

Nota: Efeito da administração do Deposteron® (CP), do Winstrol Depot® (ST) ou salina sobre o número de entradas no braço fechado (A), tempo de permanência no braço fechado (B), número de entradas no braço aberto (C) e tempo de permanência nos braços abertos (D), nos machos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões (* $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Fonte: Do Autor.

Os efeitos da administração crônica dos EAAs no teste do LCE, nas fêmeas, são mostrados na fig. 17. Foi observado um maior tempo de permanência nos braços fechados no grupo Deposteron® em relação ao grupo controle e um menor tempo de permanência nos braços abertos no grupo Deposteron® em relação ao grupo controle e ao grupo Winstrol®.

Estes dados indicam uma maior resposta ansiogênica das fêmeas do grupo Deposteron em relação ao grupo controle.

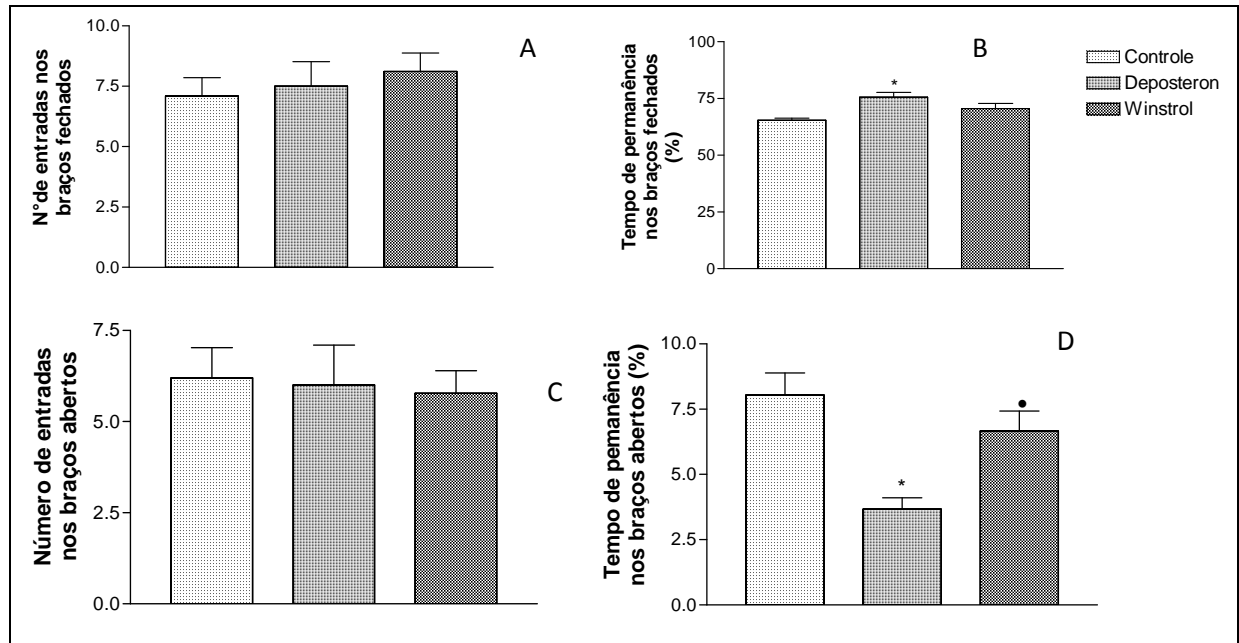


Figura 17- Gráficos ilustrativos dos parâmetros de LCE analisados (fêmeas).

Nota: Efeito da administração do Deposteron® (CP), do Winstrol Depot® (ST) ou salina sobre o número de entradas no braço fechado (A), tempo de permanência no braço fechado (B), número de entradas no braço aberto (C) e tempo de permanência nos braços abertos (D), nas fêmeas. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões. Valores expressos como média e os respectivos erros padrões (* $p < 0,001$) em relação ao grupo controle e (• $p < 0,05$) em relação ao grupo deposteron®.

Fonte: Do Autor.

6.3 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE. PARADIGMA RESIDENTE-INTRUSO.

O paradigma residente-intruso foi realizado no 35º dia (15 animais) e 36º dia (15 animais) de tratamento, onde os animais testados foram pareados com animais dóceis por 15 min.. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes no tempo de latência para o primeiro ataque e no número total de ataques entre os grupos experimentais e o grupo controle, tanto nos machos (fig. 18), quanto nas fêmeas (fig. 19). Os resultados não apontaram, portanto, alterações no comportamento agressivo dos animais tratados com EAAs e os respectivos grupos controles.

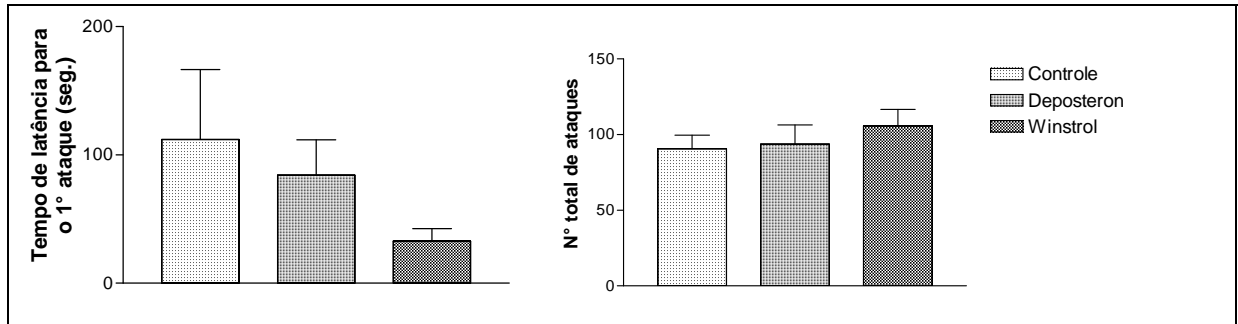


Figura 18- Gráficos ilustrando os parâmetros do teste de agressividade analisados (machos).

Nota: Efeitos da administração dos esteroides anabolizantes Deposteron® (CT) e do Winstrol Depot® (ST) sobre a latência para o primeiro ataque e o número total de ataques no paradigma residente-intruso, em camundongos machos jovens-adultos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.

Fonte: Do Autor.

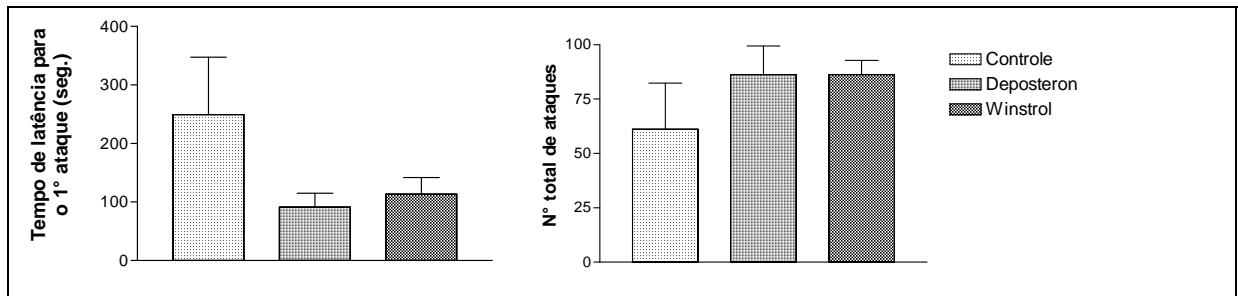


Figura 19- Gráficos ilustrando os parâmetros do teste de agressividade analisados (fêmeas).

Nota: Efeitos da administração dos esteróides anabolizantes Deposteron® (CT) e do Winstrol Depot® (ST) sobre o tempo de latência para o primeiro ataque e o número total de ataques no paradigma residente-intruso, em camundongos fêmeas jovens-adultos. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões.

Fonte: Do Autor.

6.4 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

6.4.1 Densidade neuronal na Amígdala Basolateral em machos

Foi observada uma diminuição na densidade de perfis de corpos celulares de neurônios no grupo Deposteron® quando comparados com o grupo controle, conforme mostra o gráfico 1.

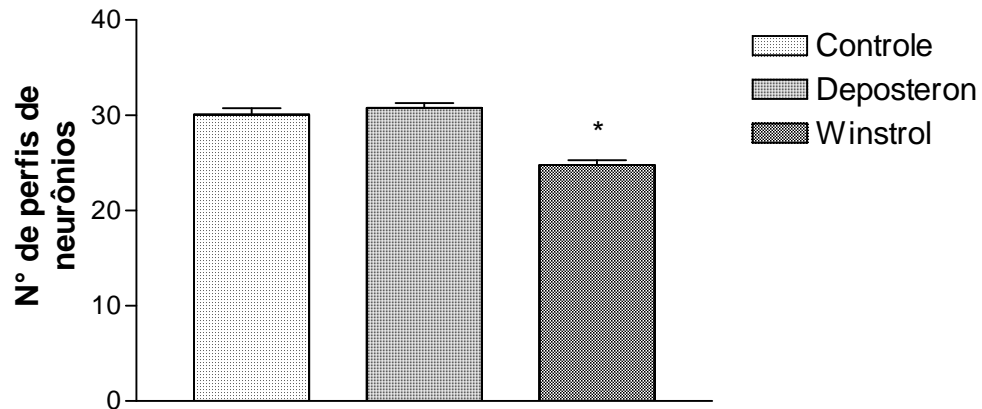


Gráfico 1- Contagem ABL machos.

Nota: Gráfico comparativo demonstrando a densidade de perfis de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral do cérebro dos camundongos machos de cada grupo experimental analisado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões (* $p < 0,001$) em relação ao grupo controle e ao grupo Deposteron.

Fonte: Do Autor.

6.4.2 Densidade neuronal na Amígdala Basolateral em fêmeas

Foi observada uma diminuição na densidade de perfis de corpos celulares de neurônios no grupo Deposteron® e Winstrol® quando comparados com o grupo controle e são mostrados no gráfico 2.

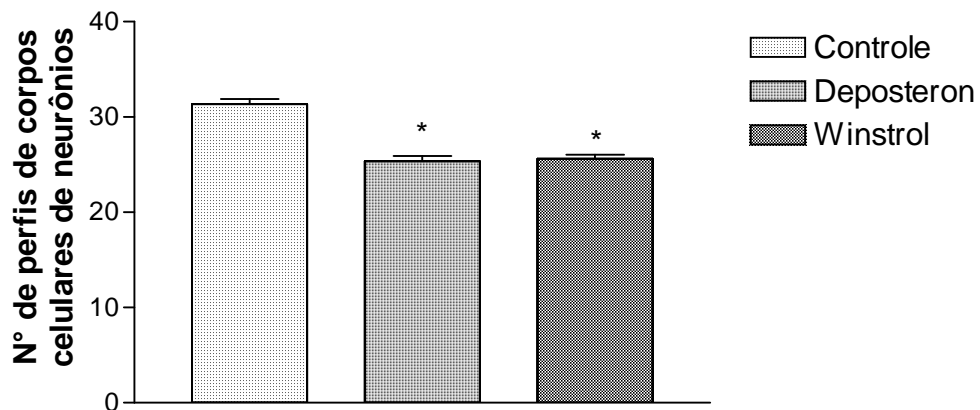


Gráfico 2- Contagem ABL fêmeas.

Nota: Gráfico comparativo demonstrando o número de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral (ABL) do cérebro dos camundongos fêmeas de cada grupo experimental analisado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões (* $P < 0,001$), em relação ao grupo controle.

Fonte: Do Autor.

6.4.3 Densidade neuronal no núcleo póstero-medial da amígdala medial em machos

Foi observada uma diminuição na densidade de perfis de corpos celulares de neurônios nos grupos Deposteron® e Winstrol®, comparados com o grupo controle (gráfico 3).

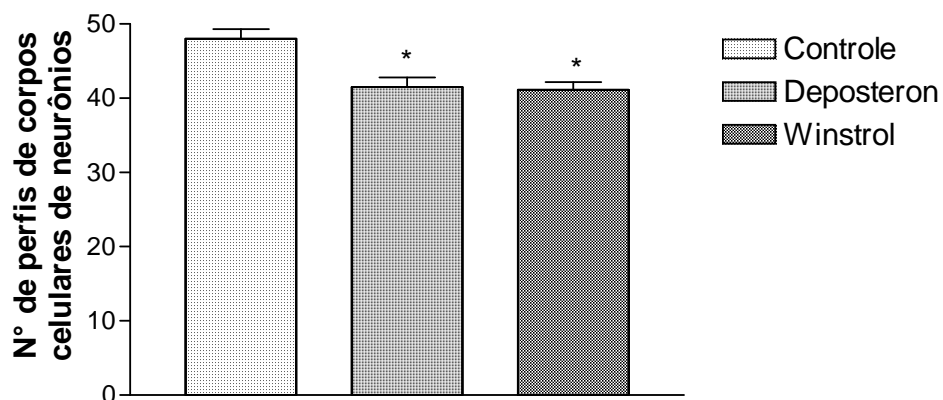


Gráfico 3- Contagem MePV machos.

Nota: Gráfico comparativo demonstrando a densidade de corpos celulares de neurônios no núcleo póstero-ventral da amígdala medial (MePV) do cérebro dos camundongos machos de cada grupo experimental analisado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões (* $P < 0,001$), pós teste de Tukey em relação ao grupo controle (Salina).

Fonte: Do Autor.

6.4.4 Densidade neuronal no núcleo póstero-medial da amígdala medial em fêmeas

Foi observada uma diminuição na densidade de perfis de corpos celulares de neurônios no grupo Deposteron® quando comparados com o grupo controle e são mostrados no gráfico 4.

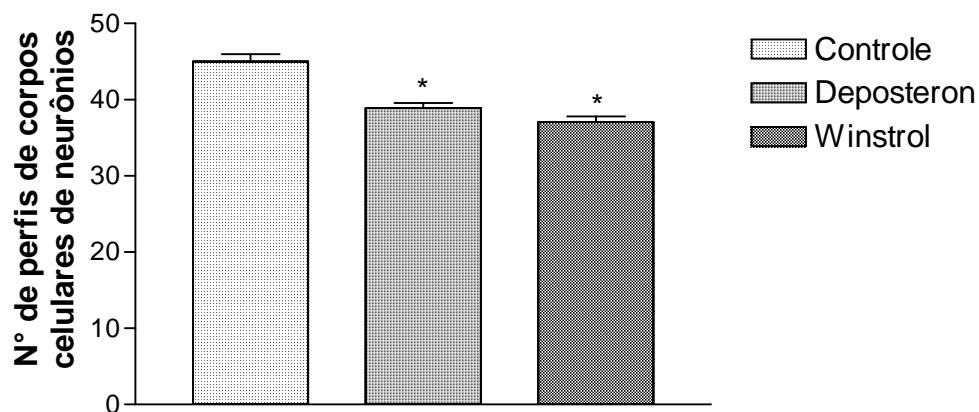


Gráfico 4- Contagem MePV fêmeas.

Nota: Gráfico comparativo demonstrando o número de corpos celulares de neurônios no núcleo póstero-ventral da amígdala medial (MePV) do cérebro dos camundongos fêmeas de cada grupo experimental analisado. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões (* $P < 0,001$), pós teste de Tukey em relação ao grupo controle (Salina).

Fonte: Do Autor.

7 DISCUSSÃO

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste clássico utilizado há muitos anos, principalmente para a identificação do efeito ansiolítico de drogas. No LCE podem ser verificados três tipos de estímulos operantes: a novidade de um ambiente que se modifica conforme é explorado (braço aberto, braço fechado, intersecção e o vazio ao redor do braço aberto), a ausência de tigmotaxia na intersecção (centro) e nos braços abertos (o ato do animal andar encostando-se à parede, tocando-a de leve com as vibrissas) e o vazio nas bordas do braço aberto (LISTER, 1987). O fato de não ter havido diferença, entre os grupos experimentais e controle, no número de entradas realizadas nos braços fechados mostra que os tratamentos utilizados não alteraram a atividade locomotora dos animais.

Pela análise geral dos resultados no teste do LCE, podemos sugerir que, tanto o Deposteron® (CT) quanto o Winstrol® (ST) estão associados ao surgimento de respostas ansiogênicas. O grupo machos Winstrol, bem como o fêmeas Deposteron apresentaram respostas indicativas de maior ansiedade. No primeiro grupo, os animais apresentaram um menor número de entradas e um menor tempo de permanência nos braços abertos do aparato (área mais aversiva). No segundo grupo, os animais apresentaram um maior tempo de permanência nos braços fechados (área menos aversiva) e menor tempo de permanência nos braços abertos (área mais aversiva). Não foram encontrados resultados significativos para os grupos machos Deposteron e fêmeas Winstrol.

O aparecimento de uma resposta ansiogênica, vem de encontro com os resultados obtidos por Ambar (2009) onde camundongos machos adultos da linhagem C57Bl/6J recebendo injeção subcutânea diária de 15 mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram um comportamento ansiogênico no LCE, após 19 dias de tratamento. Resposta ansiogênica no LCE também foi observada no trabalho de Rocha et.al., (2007), no qual ratos machos Wistar, receberam decanoato de nandrolona (5mg/Kg i.m.) 2 vezes por semana, durante 6 semanas, sendo submetidos ao LCE ao final dessas 6 semanas.

Apesar dos efeitos obtidos nestes trabalhos, outros estudos têm sugerido também um efeito ansiolítico promovido pelos EAAs, em diferentes testes comportamentais, doses e substâncias utilizadas. Aikey *et al.* (2002) observaram uma resposta ansiolítica em camundongos, representada pelo aumento do número de exploração dos braços abertos, sem alteração da atividade locomotora no teste do LCE, trinta minutos após aplicação de dose única de testosterona ou do metabólico da testosterona 3- α -androsterona-nediol. Bing *et al.* (1998), trataram ratos Wistar com dose única de testosterona (5mg/Kg), 24 horas antes do

teste do conflito de Vogel, que consiste em treinar ratos, em restrição hídrica, a lambem um tubo com água, em uma câmara operante. Após o treinamento, cada lambida é acompanhada de choque elétrico e os números de choques recebidos são registrados, sendo inversamente proporcional à ansiedade. Os autores observaram que os ratos tratados com testosterona aceitaram mais choques do que animais não tratados. Esse dado é consistente com a ação ansiolítica da testosterona, demonstrada pelo aumento da ingestão hídrica punitiva em relação ao controle. A observação de que a testosterona aumentou a resposta punitiva em ratos, suporta a teoria de que o paradigma ante conflito pode refletir não somente a ansiedade, mas também, impulsividade.

Já no estudo de Kalinine et. al., 2011, camundongos machos albinos, recebendo injeções subcutâneas diárias de Decanoato de nandrolona na concentração suprafisiológica de 15 mg/Kg, não apresentaram alterações nos níveis de ansiedade, quando submetidos ao teste do LCE no 14º dia de tratamento. Bitran *et al.* (1993) relataram que o tratamento de ratos Long-Evans com propionato de testosterona s.c. através de implantes de silicone para administração prolongada de doses suprafisiológicas, durante 6 dias, promoveu um aumento na exploração nos braços abertos do LCE, em relação ao controle, indicando redução no nível de ansiedade. Porém, no mesmo trabalho, o tratamento durante 14 dias não promoveu efeitos ansiolíticos. Segundo estes autores, esta variação de respostas se deve ao desenvolvimento de tolerância ao EAA, muito comum em usuários crônicos de drogas psicoativas.

De acordo com Fernandez-Guasti; 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 os EAAs podem apresentar efeitos ansiogênicos, ansiolíticos ou não afetar a ansiedade desses animais. O aparente conflito entre os diferentes resultados entre estudos, provavelmente estão relacionados ao uso de modelos experimentais distintos, que podem ativar diferentes vias neurais; ao uso de linhagens diferentes, que podem apresentar diferença de sensibilidade ao agente ou ao teste comportamental utilizado. Além disso, como a manipulação da molécula original de testosterona para a formulação dos EAAs influencia sua farmacocinética, biodisponibilidade e/ou o balanço das atividades androgênicas e anabólicas (CUNHA et al. 2004), as diferenças na estrutura química, nas vias de metabolização e mecanismos de ação dos EAAs sintéticos também poderiam explicar a ocorrência de diferentes efeitos comportamentais.

Diferentes neurotransmissores estão envolvidos no estabelecimento da ansiedade. Entre eles estão alguns peptídeos como o Hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a colicistocinina (CCK), os esteróides e a

corticosterona; além de aminas biogênicas representadas pela noradrenalina, serotonina e dopamina e aminoácidos como o GABA e glicina. No entanto, o GABA e a serotonina são os mais relacionados aos distúrbios da ansiedade, e ambos sofrem a influência dos esteróides anabolizantes. (GRAEFF et al. 1997).

O sistema GABAérgico é responsável pela inibição química do SNC. Os receptores gabaérgicos são acoplados a canais iônicos altamente permeáveis ao íon cloreto (Cl⁻). Quando estes receptores são ativados, os canais iônicos se abrem permitindo o influxo de Cl⁻ através da membrana neuronal a favor do gradiente eletroquímico. O influxo de cargas negativas para o interior da célula produz hiperpolarização da membrana neuronal diminuindo a probabilidade do limiar de despolarização ser atingido, causando os efeitos sedativos e hipnóticos dos agonistas e moduladores de receptores GABA, tais como os benzodiazepínicos e os neuroesteróides (KORPI; SINKKONEN, 2006). Os EAAs induzem uma ligação alostérica dos receptores GABA_A, à semelhança do Zolpidem (YANG et.al. 2002).

Além do sistema GABAérgico, a transmissão serotoninérgica também participa na modulação da ansiedade. Esta hipótese é decorrente de observações de que os ansiolíticos benzodiazepínicos diminuem a atividade dos neurônios serotoninérgicos, corroborando com a proposição da teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, a qual atribui um papel ansiogênico para a serotonina (STEIN et al. 1973).

Foi demonstrado que a serotonina ativa interneurônios GABAérgicos inibitórios no corpo amigdalóide, exercendo um tônus inibitório generalizado na excitabilidade neuronal, o que sugere que a serotonina funcione como um mecanismo de freio que limita a excitabilidade neuronal (RAINNIE, 1999). Existe a possibilidade de que um efeito inibitório dos EAAs sobre o sistema serotoninérgico possa contribuir para uma maior excitabilidade do corpo amigdalóide, que por sua vez poderia ser responsável pelas respostas comportamentais observadas no uso prolongado de EAAs (AMBAR, 2009).

Uma vez que os EAAs em altas doses (1mg/Kg) se ligam, entre outros, a receptores de glicocorticoides (FRIEDEL et al. 2006), as ações de EAAs poderiam estar relacionadas à sua ação sobre estes receptores. Os glicocorticoides podem atuar na modulação da ansiedade por suas ações no SNC, principalmente no hipocampo (OLIVEIRA et al. 2006).

Marcondes et al. (2001), ao estudarem a influência do ciclo estral sobre o nível de ansiedade em ratas submetidas no labirinto em cruz elevado 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. Em concordância com estes dados, 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; HOFFMANN et al. 2005; RENARD et al. 2005).

Como os EAA são substratos de distintas vias de metabolização, e dão origem a diferentes metabólitos, suas ações nos tecidos periféricos e no SNC, envolvem não somente o composto principal, mas também compostos derivados. Conseqüentemente, múltiplos mecanismos parecem estar relacionados às diferentes ações comportamentais dos EAAs em animais e em humanos (BITRAN et al.1996; CLARK; HENDERSON, 2003; FERNANDEZ-GUASTI; MARTINIZ-MOTA, 2005; HENDERSON et al. 2006). Tanto o Deposteron® (CT) quanto o Winstrol® (ST), por ação da 5- α -redutase, são convertidos a diidrotestosterona (DHT). No SNC, a 5- α -redutase é encontrada em maior concentração no hipotálamo e mesencéfalo, e em menores níveis na amígdala, hipocampo, cerebelo e córtex cerebral (Melcangi *et al.*, 1990). Há, entretanto, uma diferença nos metabólitos produzidos por estes EAAs, o Winstrol® é convertido somente em DHT, já o Deposteron® pode ser convertido também em estradiol pela enzima aromatase. Este composto exerce efeitos significativos no SNC não só pela sua interação farmacológica direta com os RA, mas também através de metabólitos ativos que se ligam a receptores androgênicos RE no cérebro (WILSON, 1988).

Diante do exposto até o momento, fica claro que a atuação de diferentes tipos de EAAs nos circuitos neuronais responsáveis pela elaboração de respostas de ansiedade, dentre outras, é extremamente complexa, pois pode envolver a atuação de diversos e diferentes sistemas na elaboração de uma resposta, bem como a integração de diferentes estruturas e vias neuroanatômicas na elaboração de uma resposta específica. Além disso, as próprias características individuais de cada EAA utilizado, bem como o regime de tratamento, dosagem administrada, espécie animal utilizada dentre outras tantas variáveis, exigiriam um estudo aprofundado dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta ansiogênica observada.

De uma maneira geral, podemos fazer uma interessante observação; assim como não foram notadas alterações nos números de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral (ABL) do grupo machos deposteron, a não alteração dos parâmetros de ansiedade deste grupo, vem de encontro a esse resultado. Em relação às fêmeas, apesar de ambos os EAAs terem levado a uma alteração no número de neurônios na ABL, vale lembrar que há

diferenças a serem levadas em consideração em relação aos metabólitos formados por cada um dos EAAs utilizados, pois o Deposteron® (CT), através de seus metabólitos DHT e estradiol, atua em receptores AR e ER, já o Winstrol® (ST), não é aromatizável em estradiol, formando um único metabólito, a DHT, que atua somente via receptores AR. Além disso, devemos levar em consideração a influência das alterações hormonais que acompanham o ciclo estral das fêmeas, alterando os níveis de ansiedade em ratas submetidas ao teste do LCE durante as quatro fases desse ciclo.

Para promover um controle sobre os possíveis efeitos motores e ansiolíticos dos EAAs utilizados, a atividade motora geral foi avaliada através do teste do campo aberto “open field”. Este teste, vastamente utilizado como metodologia nos estudos comportamentais, permite a quantificação da atividade motora espontânea e da exploração do ambiente. Além disso, a avaliação do efeito anti-tigmotático mostra a diminuição da preferência típica, que é relacionada com a ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003; VALLE, 1970).

A metodologia de campo aberto contribuiu para a análise dos possíveis efeitos da administração dos EAAs sobre a locomoção dos animais. Observamos que para os dois grupos experimentais não houve alteração significativa de nenhum dos parâmetros analisados, ou seja, no número de entradas no centro, entradas na periferia, número total de entradas e na razão entre as entradas no centro sobre o total de entradas (efeito anti-tigmotático) quando comparados ao grupo controle. Isso mostra que os EAAs não alteraram o padrão motor dos animais e que os grupos se comportaram de maneira homogênea no que tange ao controle periférico da musculatura esquelética, coordenação sensório-motora, elaboração e interpretação da informação sensorial, bem como em relação aos aspectos relacionados à diminuição da ansiedade e medo (PRUT; BELZUNG, 2003; VALLE, 1970).

Diferentes trabalhos à respeito dos efeitos dos EAAs sobre a locomoção espontânea no campo aberto ou câmara de atividade, tanto em ratos como em camundongos machos, mostram que este parâmetro comportamental geralmente não é afetado pelo tratamento (BING et al. 1998; BITRAN et al. 1993; CLARK; FAST, 1996; CLARK; HARROLD, 1997; MINKIN, MEYER; VAN HAAREN, 1993).

No teste de agressividade, os parâmetros analisados no paradigma intruso-residente não foram indicativos de alterações no comportamento agressivo dos animais dos grupos tratados em relação ao grupo controle, apesar da ABL e do MePV apresentarem um menor número de perfis neuronais em relação ao grupo controle.

No paradigma intruso-residente, obtem-se dados de uma agressividade reativa e impulsiva, a qual está associada a um papel dos EAAs de aumentar a sensibilidade do

indivíduo aos estímulos externos e reduzir o limiar para respostas agressivas e de dominância frente a ameaças sociais (BREUER et al. 2001; MCGINNIS et al. 2002).

Os efeitos comportamentais obtidos por doses suprafisiológicas de nandrolona, que coletivamente sugerem uma desinibição comportamental, poderiam ser parcialmente explicados por distúrbios na neurotransmissão serotoninérgica, pois, a interrupção da mesma tem sido associada à agressão e violência por uma variedade de métodos (VOLAVKA, 2004).

Muitos trabalhos trazem resultados de aumento da agressividade pelo uso de EAAs tanto no paradigma residente-intruso (AMBAR; CHIAVEGATTO, 2009 e NELSON; CHIAVEGATTO, 2000), quanto em outros testes. Steensland et. al. (2005) examinaram os efeitos da administração crônica do EAA Decanoato de Nandrolona (DN) na alteração dos pesos corporais e posturas dominantes e submissas de ratos mantidos em condições de gaiolas duplas; os animais que receberam o DN exibiram aumento de peso, postura dominante e agressiva em relação aos controles.

LINDQVIST; FAHLKE, 2005, usando um teste de competição para ingestão da água como medida de agressividade, demonstraram que ratos machos tratados com DN apresentaram dominância diante do acesso ao bebedouro em relação ao grupo controle e o estudo de Farrell & McGinnis (2003) demonstrou que a provocação física estimula a agressividade em ratos tratados com T, DN e estanozolol (ST). Todavia, na ausência de provocação física os animais tratados com T, DN e ST não demonstraram comportamento agressivo em nenhum dos três grupos, quando comparados ao grupo controle (MCGINNIS et al. 2002).

Em contrapartida, outros trabalhos mostraram resultados diferentes; Breuer et al. (2001), administraram propionato de T, DN e estanozolol em ratos Long-Evans (5mg/kg, 5 vezes por semana durante 12 semanas). O comportamento agressivo aumentou significativamente no grupo tratado com propionato de T quando comparado com o grupo controle; o grupo tratado com DN e o grupo controle demonstraram níveis similares de agressividade. Surpreendentemente, o grupo tratado com estanozolol exibiu níveis significativamente menores de agressividade que os grupos T e DN, e da mesma maneira quando comparado ao controle. Este efeito paradoxal do estanozolol (ST) em abolir o comportamento agressivo foi atribuído aos diferentes mecanismos de ação envolvendo alvos celulares e moleculares dos EAA no SNC.

O comportamento agressivo, assim como o de ansiedade, é dependente da associação de diferentes estruturas neuroanatômicas, assim como da atuação de diversos e diferentes mecanismos moleculares de sinalização neuronal que podem sofrer influência direta ou

indireta dos EAAs administrados. Assim, diferentes circuitos neurais e moléculas sinalizadoras estão envolvidos no comportamento de agressão e sofrem influências da ação dos esteróides anabolizantes.

Estudos tentam correlacionar as alterações comportamentais aos efeitos dos EAA nas neurotransmissões centrais serotoninérgicas, gabaérgicas, entre outras, em diversas áreas do cérebro (HALLBERG et al. 2000).

No estudo de McIntyre et al. (2002), foi observado que 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.

Hamsters tratados com decanoato de nandrolona durante seu período de desenvolvimento apresentaram aumento do receptor V1A em estudos de ligação (*estudos de "binding"*) e na densidade de fibras imunorreativas de arginina vasopressina no hipotálamo anterior e em áreas cerebrais relacionadas à agressividade (DE LEON et al. 2002). Camundongos tratados com a mesma droga cronicamente apresentaram diminuição na quantidade de RNAm do receptor dopaminérgico D1 nos núcleos caudado-putâmen e núcleo *acumbens* (KINDLUNDH et al. 2003), receptor também implicado à modulação do comportamento agressivo (VOLAVKA et al. 2004). O envolvimento glutamatérgico foi recentemente demonstrado em hamsters adolescentes tratados com EAA pelo aumento nos neurônios que expressam glutamato e na expressão do receptor glutamatérgico GluR1 em áreas específicas de agressividade (FISCHER et al. 2007).

Diversos estudos atuais têm demonstrado interações sinérgicas entre o glutamato e os esteróides gonadais, interações que podem coordenar diversas funções hipotalâmicas e límbicas (BRANN; MAHESH, 1994). Por exemplo, a administração de estradiol e progesterona induziram a um aumento nos sítios de implantação para o glutamato no hipotálamo de ratas (WEILAND, 1992). A taxa de liberação de glutamato também é aumentada na área pré-óptica medial durante um pico induzido de LH (JARRY et al. 1992).

O interessante trabalho de Diano (1997), forneceu evidências para a co-localização de AMPA gluR (receptor glutamatérgico) e receptores esteróides gonadais em áreas límbicas e hipotalâmicas de ratos. As análises mostraram que, na amígdala medial, aproximadamente 50% dos neurônios contendo receptores ER/AR co-expressam AMPA GluR. Além disso, o trabalho demonstrou também que os neurônios regulados pelo glutamato no hipotálamo são alvos diretos de esteróides gonadais, e que, alterando a expressão da AMPA GluR, os androgênios e estrogênios podem facilmente influenciar a neurotransmissão excitatória nessas

áreas, levantando a possibilidade de que na via quimiosensorial, o glutamato é um neurotransmissor dominante.

Diante do fato de haver interações sinérgicas entre o glutamato e os esteróides gonadais coordenando diversas funções hipotalâmicas e límbicas, as estruturas amigdalóides dos grupos tratados, mesmo apresentando um número menor de neurônios em relação ao grupo controle, podem, por meio das altas concentrações locais de EAAs, estimular a transmissão glutamatérgica, aumentando as sinalizações excitatórias nestes neurônios e mantendo as respostas de agressividade estatisticamente iguais as do grupo controle. Ao mesmo tempo, devemos levar em consideração a capacidade dos EAAs afetarem as transmissões gabaérgicas e serotoninérgicas, podendo também resultar numa maior excitação destes neurônios. Diante deste quadro, torna-se necessária a realização de novos estudos buscando evidenciar como os EAAs levaram à estas alterações nas respostas comportamentais.

Na avaliação do número de perfis de corpos celulares de neurônios, podemos observar que, tanto o Winstrol®, quanto o Deposteron® podem levar a uma diminuição no número destes perfis celulares em camundongos. Observamos uma diminuição estatisticamente significativa neste número na ABL dos grupos machos Winstrol®, fêmeas Deposteron® e fêmeas Winstrol®, quando comparados com seus respectivos grupos controle. Observamos também, este mesmo resultado na MePV de todos os grupos experimentais. Estes resultados vêm de encontro aos resultados obtidos por Damião, et al. (2012).

De uma maneira geral, parece que os EAAs em doses fisiológicas, possuem a capacidade de exercer um papel neuroprotetor, entretanto, quando os EAAs são administrados em altas concentrações, eles parecem passar a exercer um efeito deletério às células nervosas. Em sua maioria, os estudos apontam um efeito excitotóxico exercido por estas concentrações. Orlando et.al. (2007), descobriram que o pré-tratamento com testosterona aumentou a toxicidade do NMDA, mas apenas em concentrações supra-fisiológicas (10 µM). Baixas concentrações de testosterona, por outro lado, exerceram papel neuroprotetor, mas tornou-se neurotóxico na presença de inibidores da aromatase. Resultados parecidos foram obtidos por Estrada et.al. (2006).

O trabalho de Okamoto et.al. (2012), demonstrou que a neurogênese hipocampal adulta em ratos machos ocorre via mediação da DHT. YANG et.al. (2002), demonstraram que em cultura de células hipocampais de camundongo, altas concentrações de testosterona aumentaram a toxicidade induzida por concentrações milimolares de glutamato; ao passo que

o andrógeno DHEA, um precursor metabólico precursor da testosterona, exerceu um papel neuroprotetor (CARDOUNEL et.al. 1999).

Em estudos *in vivo*, neuroesteróides androgênicos, como DHEA, testosterona e a DHT, exercem papel protetor no hipocampo contra danos induzidos por excitotoxinas, ácido caínico e ácido domóico (FRYE; REED, 1998; RAMSDEM et.al. 2003). No estudo de Azcoitia et.al. (2001), a neuroproteção foi totalmente dependente da disponibilidade da enzima aromatase, a qual converte a testosterona em estradiol.

Surpreendentemente, pouco se sabe sobre como os andrógenos afetam a morte neuronal excitotóxica à despeito do grande número de dados obtidos com esteróides femininos. A excitotoxicidade se refere a um mecanismo particular de morte neuronal desencadeada por uma estimulação excessiva de receptores glutamatergicos (CHOI, 1994; ROTHMAN; OLNEY, 1995). Este tipo de morte, que pode incorporar características de necrose ou apoptose, contribui amplamente para a patofisiologia de muitas desordens neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo o AVC, estados de epilepsia, hipoglicemia, coma doença de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral, doença de Huntington e Alzheimer (CHOI, 1988).

Vista a estreita conexão entre os EAAs e o sistema glutamatergico, é importante salientar o potencial neurotóxico que o glutamato pode exercer nas células das áreas estudadas. O estudo que sugeriu que o L-Glu poderia atuar como uma neurotoxina baseou-se na observação de que injeções de L-Glu provocavam destruição das camadas mais internas da retina de camundongos (LUCAS; NEWHOUSE, 1957). Essa constatação foi posteriormente replicada e expandida por Olney (1978).

Os receptores NMDA localizam-se na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias e exibem maior permeabilidade ao Ca^{2+} do que os receptores AMPA e KA, característica que lhes confere um papel mais ativo em mecanismos neurotóxicos. Quando a membrana pós-sináptica está em seu potencial de repouso, os canais NMDA encontram-se bloqueados por um íon magnésio (Mg^{2+}) que impede o influxo de Ca^{2+} para o terminal pós-sináptico. No entanto, sob despolarização pós-sináptica (que pode ser originada pela ativação de receptores AMPA, dentre outros), os íons Mg^{2+} são expulsos dos canais NMDA, o que permite o influxo de Ca^{2+} a favor de seu gradiente de concentração (KUBO; ITO, 2004). No citosol, o Ca^{2+} é um importante segundo mensageiro e influencia um grande número de funções celulares, exercendo um papel regulatório em processos de proliferação e sobrevivência celular, bem como na morte celular por necrose ou apoptose (ORRENIUS et.al. 1996). O influxo de Ca^{2+} regula a excitabilidade da membrana e a intensidade da transmissão

sináptica através da ativação de cascatas de sinalização intracelular dependentes deste íon. Concentrações excessivas de L-Glu na fenda sináptica resultam na hiperestimulação de seus receptores e entrada de Ca^{2+} excessiva no terminal pós-sináptico, que somadas à liberação do Ca^{2+} das reservas intracelulares, elevam a concentração de Ca^{2+} acima do limiar ativador de mecanismos regulatórios ativando os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade que culminam na morte neuronal (SATTLER; TYMIANSKI, 2000).

As observações de Diano et al. (1997), demonstraram que os neurônios regulados pelo glutamato no hipotálamo são alvos diretos de esteroides gonadais, tanto os androgênios quanto os estrogênios. Assim, eles podem facilmente influenciar a neurotransmissão excitatória nessas áreas de uma maneira sexualmente dimórfica. Este fato pode explicar o fato de o Deposteron® ter levado à redução do número de corpos celulares nas Amígdalas Basolaterais das fêmeas, mas não nas dos machos.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas análises quantitativas, somados aos resultados comportamentais, sugerem que os EAAs cipionato de testosterona (CT) e o estanozolol (ST), em doses supra-fisiológicas, são capazes de provocar uma redução do número de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral e no Núcleo Pósterio-Ventral da Amígdala Medial de camundongos. Além disso, podem estimular respostas emocionais de ansiedade e agressividade, que são associadas a estas áreas.

Assim, os EAAs utilizados de forma abusiva podem levar a sérios danos ao SNC. Sugerimos que estas substâncias, administradas de forma crônica e em concentrações supra-fisiológicas, levaram a morte neuronal, inferindo uma ação potencialmente neurotóxica dos EAAs. De acordo com a literatura, a morte neuronal é, muitas vezes, decorrente do potencial excitotóxico do glutamato, o qual pode ter sua ação estimulada pelos EAAs. Estes dados apontam para a necessidade de realização de novos trabalhos para avaliar as relações entre EAAs, sistema glutamatérgico e excitotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ABOUDKHIL, S. et al. Effects of castration, Depo-testosterone and cyproterone acetate on lymphocyte T subsets in mouse thymus and spleen. **Scand J Immunol**, v. 34, n.5, p. 647-53, 1991.

AGGLETON J. **The Amygdala: A Functional Analysis**. New York, N.Y: Oxford University Press, 2000.

AIKEY J.L. et al. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). **Horm Behav**. v.42, n.4, p.448-460, 2002.

ALHEID, G.F.; DE OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A. Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G. **The Rat Nervous System**. San Diego: Academic Press, 1995.

AMARAL, D.G; WITTER, M.P. Hippocampal formation. In: Paxinos G. **The Rat Nervous System**. Academic Press, San Diego Academic Press, 1995.

AMBAR, G.; CHIAVEGATTO, S. Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, p. 161-173, 2009.

APTER, A. et al. Interrelationships among anxiety, aggression, impulsivity, and mood: a serotonergically linked cluster? **Psychiatry Res**, v.32, p. 191–199, 1990.

BAHRKE, M. S. et al. Psychological and behavioural effects of endogenous testosterone levels and anabolic–androgenic steroids among males. **A review. Sports Med**, v.10, p.303–337, 1990.

BARBAS H. Anatomic basis of cognitive emotional interactions in the primate pré frontal cortex. **Neurosci.Biobehav.Rev**. v.19, p.499–510, 1995.

BARFIEDS, R. J. et al. Gonadal influence on agonistic behavior in the male domestic rat. **Horm Behav**, v. 3, n.3, p.247–259, 1972.

BASARIA, S.; WAHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n.11, p. 5108–5117, 2001.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências**: desvendando o sistema nervoso. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

BING O. et al. High doses of testosterone increase anticonflict behaviour in rat.. **Eur Neuropsychopharmacol**. v.8, n.4, p.321-323, 1998.

BITRAN, D.; LELLOGD, C.K.; HILVERS, R.J. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. **Horm Behav**, v. 27, n.4, p. 568–83, 1993.

BLOOM, F.E. - Neurotransmitters: past, present, and future directions. **FASEB J**. v.2, p.32-41, 1988.

BOLDING, G.; SHERR, L.; ELFORD, J. Use of anabolic steroids and associated health risks among gay men attending London gyms. **Addiction**, v. 97, p. 195–201, 2002.

BRANN, D.W.; MAHESH, V.B. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. **Front Neuroendocrinol**, v. 1, p.3–49, 1994.

BRANN, D.W.; MAHESH V.B. Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol**, v 53, p. 325–329, 1995

BREUER M.E. et al. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. **Horm Behav**. v.40, n.3, p. 409–18, 2001.

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.

BROOKS, J.H.; REDDON, J.R. Serum testosterone in violent and nonviolent young offenders. **J Clin Psychol**. v.52, n.4, p.475–483, 1996.

BROTHERS, L. A biological perspective on empathy. **Am.J. Psychiatry** v.146, p.10–19, 1989.

BROWER, K.J. Anabolic steroids. **Psychiatr Clin North Am**. v.16, n.1, p. 97–103, 1993.

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

BRUNNER, C.A., VARGAS, I. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. **Physiol Behav**. v.55, n.1, p. 21-8, 1994.

CAMERON, H.A.; GOULD E. Distinct populations of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy. **J Comp Neurol**. v.20, n.369(1), p.56-63, 1996.

CARDOUNEL A., REGELSON W., KALIMI M. Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. v.222, p.145–149, 1999.

CAROBRES, 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.

CAVALCANTE, J. C. et al. Distribution of urocortin 3 neurons innervating the ventral premammillary nucleus in the rat brain. **Brain Research**, v. 1089, p. 116-125, 2006.

Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas psicotrópicas (CEBRID)
Disponível em: http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/lev_domiciliar2005/index.htm.

CELOTTI, F.; CESI, P.N. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **J Steroid Biochem Molec Biol**. v.43, n.5, p.469-77, 1992.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron** v.1, p.623–634, 1998.

_____ Calcium and excitotoxic neuronal injury. **Ann.N.Y. Acad. Sci**. v.747, p.162–171, 1994.

CLARCK, A.S.; FAST, A.S. Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats. **Behav Neurosci**. v.110, n.6, p.1478–1486, 1996.

CLARK, A.S; HARROLD, E.V. Comparison of the effects of stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate on the sexual behavior of castrated male rats. **Behav Neurosci.** Dec; v.111, n.6, p.1368-74, 1997.

CLARK, A.S; MITRE, M.C; BRINCK-JOHNSEN, T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. **Brain Res.**v. 679 n.1, p. 64–7, 1995.

CLARK, A.S.; HENDERSON, L.P. Behavioral and physiological responses to anabolicandrogenic steroids. **Neurosci Biobehav Rev.** v.27, n.5, p. 413-436, 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 Res.**v.1126, n.1, p.122-38, 2006.

CLEMENT, J. et al. Agedependent 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.

CONWAY, A.J. et al. Use, misuse and abuse of androgens. The Endocrine Society of Australia consensus guidelines for androgen prescribing. **Med J Aust.** v.172, n.5, p. 220- 224, 2000.

COOPER, C.J. et al. A high prevalence of abnormal personality traits in chronic users of anabolic-androgenic steroids. **Br J Sports Med.** v.30, n.3, p. 246–250, 1996.

CORRIGAN, B. Anabolic steroids and the mind. **Med J Aust** v.6, p.165-222, 1996.

CREUTZBERG, E.C. et al.A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo controlled, randomized trial. **Chicago.** v.124, n.5, p.1733-42, 2003.

CUNHA, T.S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Rev Bras Ciênc Farmac.** v.40, n.2, p.165–79, 2004.

DA SILVA P.R.P. Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. **Rev Bras Med Esporte** v.8, n.6, p.235-43, 2002.

DABBS, J.M.; MORRIS, R. Testosterone, social class, and antisocial behavior in a sample of 4462 men. **Psycholog. Sci.** V.1, p.209–211, 1990.

DALL'OGGIO, A. et.al. Dendritic branching features of Golgi-impregnated neurons from the "ventral" medial amygdala subnuclei of adult male and female rats. **Neurosci Lett.** v.18, n.3, p.287-92, 2008.

DAMIÃO, B. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteroides Anabolizantes. **Revista de Neurociências**, v.20, p. 68-72, 2012.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.** v.65, n.1, p.1–105, 2001.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala**. New York: Wiley-Liss, p. 255-306, 2000.

DAVIS, M., SHI, C. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.877, p.281–291, 1999.

DE CASTILHOS et al. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: a Golgi study. **Brain Res.** v.13, n.1240, p.73-81, 2008.

DE GELDER, B. et al. Fear fosters fight: a mechanism for fear contagion when perceiving emotion expressed by a whole body. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.101, n.47, p.16701-6, 2004.

DELEON, K.R.; GRIMEWS, J.M.; MELLONI, R.H. Jr. Repeated Anabolic-Androgenic Steroid Treatment during Adolescence Increases Vasopressin V1A Receptor Binding in Syrian Hamsters: Correlation with Offensive Aggression. **Hormones and Behavior.** v.42, n.2, p. 182–191, 2002.

DELVILLE, Y.; DE VRIES, G.J.; FERRIS, C.F. Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. **Brain Behav**, v. 55, p.53–76, 2000.

DEMLING, R.H.; ORGILL, D.P. Anticatabolic and wound healing effects of the testosterone analog oxandrolone after severe burn injury. **J Crit Care.** v.15, n.1, p.12-7, 2000

DIANO, S.; NAFTOLIN, F.; HORVATH, T.L. Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor- containing neurons in the rat hypothalamus, septum, and amygdala: a morphological and biochemical study. **Endocrinology.** v.138, p.778–789, 1997.

DIMEO, A.N., WOOD, R.I. Self-administration of estrogen and dihydrotestosterone in male hamsters. **Horm. Behav.** v.49, p.519–526, 2006.

ENGLISH, K.M. et al. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Circulation.** v.102, n.16, p. 1906-1911, 2000.

ERNST, M.; FUDGE, J.L. A developmental neurobiological model of motivated behavior: anatomy, connectivity and ontogeny of the triadic nodes. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.33, p.367–382, 2009.

ESTRADA, M.; VARSHNEY, A.; EHRLICH, B.E. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. **J. Biol. Chem.** v.281, p.24501–25492, 2006.

EVANS, N.A. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. **Am J Sports Med.** v.32, n.2, p.534–542, 2004.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev.** v.52, n.4, p.513–556, 2000.

FARRELL, S.F.; MCGINNIS, M.Y. Effects of pubertal anabolic-androgenic steroid (AAS) administration on reproductive and aggressive behaviors in male rats. **Behav Neurosci.** v.117, n.5, p. 904–911, 2003.

FEHON, D.C.; GRILO, C.M.; LIPSCHITZ, D.S. Correlates of community violence exposure in hospitalized adolescents. **Compr. Psychiatry.** v.42, p.283–290, 2001.

FENICHEL, G.M. et.al. A randomized efficacy and safety trial of oxandrolone in the treatment of Duchenne dystrophy. **Neurology.** v.56, n.8, p.1075-1079, 2001.

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.

FERRIS, C.F.; STOLBERG, T.; DELVILLE, T. Serotonin regulation of aggressive behavior in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Behav Neurosci.** v.113, n.4, p.804-15,1999.

FISCHER S.G., RICCI L.A., MELLONI 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. **Behav Brain Res.** v.180, n.1, p. 77-85, 2007

FRIEDEL, A., et.al. 17beta-hydroxy-5alpha-androst-1-en-3-one (1-testosterone) is a potent androgen with anabolic properties. **Toxicol Lett.** v.165, n.2, p.149-155, 2006.

FRYE C.A., REED T.A. Androgenic neurosteroids: anti-seizure effects in an animal model of epilepsy. **Psychoneuroendocrinology.** v.23, p.385–399, 1998.

GALEA, L.A. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. **Hippocampus.** v.16, n.3, p. 225-32, 2006.

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed., New York: McGraw-Hill, 2006.

GRIVETTI, L.E.; APPELEGATE, E.A. From Olympia to Atlanta: a cultural-historical perspective on diet and athletic training. **J Nutr.** v.127, n.5, p. 860–868. 1997.

GUILLOT, P.V; CHAPOUTHIER, G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. **Behav. Brain Res.** v.77, p.211–213, 1996.

HALÁSZ, J. et al. Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: involvement of fear- and stress-related structures. **Eur. J. Neurosci.** v.15, p.561–569, 2002.

HALL, R.C.; HALL, R.C.; CHAPMAN, M.J. Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. **Psychosomatics.** v.46, n.4, p. 285–290, 2005.

HALLBERG, M. et al. Anabolic-androgenic steroids affect the content of substance P and substance P(1-7) in the rat brain. **Peptides.** v.21, n.6, p. 845-852, 2000.

HARDING, C.F. Hormonal influences on avian aggressive behavior. In: Svare, B.B. **Hormones and Aggressive Behavior**. Plenum, New York: Plenum, p. 435–467, 1983.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. **Sports Med.** v.34, n.38, p.513–554, 2004.

HATAKA, Y. et al. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. **Biochem Biophys Res Commun** v.381, p.728–732, 2009.

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.

HEBERT, A. et al. Anabolic steroids: a review of the literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v.12, p.469-84, 1984.

HENDERSON, L.P. et al. Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. **Neuroscience**. v.9, p.138-793, 2006.

HERMAN, J.P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Prog. Neuro-psychopharmacol.* **Biol. Psychiatry** v.29, p.1201–1213, 2005.

HICKSON, R.C. et al. Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids. **Medicine Science and Sport Exercise**, v.22, p.331-40, 1990.

HÖISTAD, M.; BARBAS, H. Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. **Neuroimage**. v.40, n.3, p.1016-33, 2008.

HOJO, Y. et al. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. **Endocrinology**. v.150, p.5106–5112, 2009.

INMANDAR DODDAMANI, L.S.; JAYAMMA, Y. Acceleration of neutrophil precursors' maturation and immunostimulation of CD3+, CD4+ lymphocytes by stanozolol in mice. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v.129, n.3-5, p.172, 2012.

IRIART, J.A.B. & ANDRADE, T.M. Body-building, steroid use, and risk perception among young body-builders from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil. **Cad Saúde Pública**. v.18, n.5, p.1379-1387, 2002.

JARRY, H.; LEONHARDT, S.; WUTTKE, W. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. **Neuroendocrinology**. v.56, p.133–140, 1992.

JOHANSSON-STEENSLAND, P.; NYBERG, F.; CHAHL, L. The anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases the density of Fos-like immunoreactive neurons in limbic regions of guinea-pig brain. **Eur J Neurosci.** v.15, n.3, p.539-44, 2002.

JOUMAA, W.H., LÉOTY, C. Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow skeletal muscles. **Med Sci Sports Exerc.** v.33, n.3, p.397-403, 2001.

KALININE, E. et.al. Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. **Horm Behav.** v.14, 2014.

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

KARBALAY-DOUST, S. et al. Reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. **Asian J Androl,** v. 9, n.2, p. 235–239, 2007.

KERR J.E. et al. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. **Endocrinology.** v.136, p.3213–3221, 2002.

KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol.**v.154, n.3, p. 502–521, 2008.

KIMOTO, T. et.al. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calciumdependent synthesis. **Endocrinology.** v.142, p.3578–3589, 2001.

KINDLUNDH, A.M. et.al. The anabolic-androgenic steroid nandrolone induces alterations in the density of serotonergic 5HT1B and 5HT2 receptors in the male rat brain. **Neuroscience.** v.119, n.1, p. 113- 120, 2003.

KLING, A. S.; BROTHERS, L. A. The amygdala and social behavior. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala.** New York: Wiley-Liss, p. 353-377, 1992.

KOCHAKIAN, C.D. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. **Wien Med Wochenschr.** v.143, n.14-15, p. 359–63, 1993.

KONDO, Y.; ARAI, Y. Funcional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. **Physiology and Behavior**, v. 57, p. 69-73, 1995.

KONKE A.T.; MCCARTHY M.M. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. **Endocrinology** v.152, p.223–235, 2011.

KOPERA, H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. **Acta Endocrinol Suppl.** v.271, p.11–8, 1985.

KORPI, E.R.; SINKKONEN, S.T. GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. **Pharmacol Ther.** v.109, n.1-2, p.12-32. Epub 2005 Jul 5, 2006.

KRETZ, O. et al. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. **J Neurosci.** v.24, p.5913–5921, 2004.

KUBLI-GARFIAS, C. et.al. Depressant effect of androgen on the cat brain electrical activity and its antagonism by rithenium red. **Neuroscience**, v.7, p.2777-82, 1982.

KUBO, M.; ITO, E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. **Proteins** v.56, p. 411-9, 2004.

KUHN, C.M. Anabolic Steroids. **Recent Progress in Hormone Research.** v.57, p.411-34, 2002.

LeDOUX, J. E. Emotion and amygdala. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala.** New York: Wiley-Liss, p. 339-352, 1992.

_____ Evolution of human emotion: a view through fear. **Prog. Brain Res.** v.195, p.431–442, 2012.

LE GREVÈS, P. Effects of an anabolic-androgenic steroid on the regulation of the NMDA: receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in brain regions of the male rat. **Neurosci Lett.** v.226, n.2, p.61–64, 1997.

LINDQVIST, A.S.; FAHLKE, C. Nandrolone decanoate has long-term effects on dominance in a competitive situation in male rats. **Physiol Behav.** v.84, n.1, p.45-51, 2005.

- LISE, M.L. et al. Abuse of anabolic-androgenic steroids in sports. **Rev Assoc Med Bras.** v.45, n.4, p.364-70, 1999.
- LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology.** v.92, n.2, p. 180-185, 1987.
- LUCAS, D.R.; NEWHOUSE, J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **Arch Ophthalmol** v.58, p.193-201, 1957.
- LUKAS, S.E. CNS effects and abuse liability of anabolic-androgenic steroids. **Ann Rev Pharmacol Toxicol.** v.36, p.333–57, 1996.
- MACLUSKY, N.J. et.al. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. **Neuroscience.** v.138, p.957–965, 2006.
- MANDARIN-DE-LACERDA, C.A. **Manual de quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria e Estereologia.** 2.ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994.
- _____ Stereological Tools in Biomedical Research, **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v.75, n.4, p.469-486, 2003.
- 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.
- MCCAULEY, L.D. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors and the regulation of steroidogenesis in rat brain mitochondria. **Adv Biochem Psychopharmacol.** v.47, p.143-7, 1992.
- MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Dialogues Clin Neurosci.** v.8, p.367-381, 2006
- MCGINNIS, M. Y. Anabolic Androgenic Steroids and Aggression Studies Using Animal Models. **Ann N Y Acad Sci.** v.1036, p.399–415, 2004.
- MCGINNIS, M.Y. et.al. Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids. **Horm Behav.** v. 41, p101–10, 2002.

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

MELCANGI R.C. et al. Differential localization of the 5 alpha-reductase and the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. **Endocrinology**. v.132, p.1252-1259, 1993.

MELCANGI, R.C. et al. - 5a-reductase activity in isolated and cultures neuronal and glial cells of the rat. **Brain Res**. v.516, p.229-36; 1990.

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

MINKIN, D.M.; MEYER, M.E. ; HAAREN, F. Behavioral effects of long-term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. **Physiol. Behav**. v.44, p. 959-963, 1993.

MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E.; KORENMAN, S.G. Biological actions of androgens. **Endocr Rev**. v.8, n.1, p.1-28, 1987.

NELSON, R.J; CHIEVEGATTO, S. Aggression in knockout mice. **Inst Lab Anim Res J**. v.41, n.3, p.153-162, 2000.

NELSON, R.J.; TRAINOR, B.C. Neural Mechanisms of aggression, **Nature Reviews/ Neuroscience**. v.8, July, 2007.

OKAMOTO, M. et al. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. **PNAS**, v. 109, n.132, 2012.

OLIVEIRA, M. et al. Induction of a hyperanxious state by antenatal dexamethasone: a case for less detrimental natural corticosteroids. **Biol Psychiatry**. v.59, n.9, p.844-852, 2006.

OLWEUS, D. Testosterone and adrenaline: aggressive antisocial behavior in normal adolescent males. In: Mednick, S.A., Moffitt, T.E., Stack, S.A. **The Causes of Crime: New Biological Approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 239-262, 1987.

ORLANDO, R. et al. Nanomolar concentrations of anabolic–androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical culture. **Brian Research**, v.1125, p.21-29, 2007.

ORRENIUS, S.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P. Mechanisms of calcium-related cell death. **Adv Neurol** v.71, p.137-51, 1996.

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.

PARROT, A.C.; CHOI, P.Y.; DAVIES, M. Anabolic steroid use by amateur athletes: effects upon psychological mood states. **J Sports Med Physical Fitness**. v.34, n.3, p. 292, 1994.

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

PERSKY, H.; SMITH, K.D.; BASU, G.K. Relation of psychologic measures of aggression and hostility to testosterone production in man. **Psychosom. Med**. v.33, p.265–277, 1971.

PETERS, K.D.; WOOD, R.I. Androgen dependence in hamsters: overdose, tolerance, and potential opioidergic mechanisms. **Neuroscience**. v.130, p.971–981, 2005.

PITKÄNEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLETON, J. P. **The Amygdala**. Oxford: University-Press, p. 31-115, 2000.

POPE, H.G. JR. & KATZ, D.L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am J Psychiatry**. v.145, 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.28, n.463(1-3), p.3-33, 2003.

PRYBYŁOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem**. V.279, p.9673-6, 2004.

QUIRK, G. J.; REPA, C.; LeDOUX, J. E. Fear conditioning enhances short latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, p. 1029-1039, 1995.

RAINNEIE, D.G. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. **J Neurophysiol.** v.82, n.1, p.69–85, 1999.

RAMSDEN, M.; SHIN, T.M.; PIKE, C.J. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion. **Neuroscience.** v.122, p.573–578, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. & GARDNER, P. - **Pharmacology** - 6a. ed., New York: Elsevier, 2008.

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Funcional activities of the amygdala: an overview. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 14-23, 2000.

RASIA-FILHO, A. A.; HILBIG, A. Papel da amígdala e do hipocampo no transtorno do estresse pós traumático. Em: CAMINHA, R.M. **Transtornos do estresse pós traumático**. Editora Casa do Psicólogo, parte I, p. 37-53, 2005.

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

RICCI, L.A.; THOMAS, R.M.; RICHARD, H.M. Serotonin modulates anxiety-like behaviors during withdrawal from adolescent anabolic–androgenic steroid exposure in Syrian hamsters. **Hormones and Behavior.** v.62, p.569–578, 2012.

ROCHA, V.M. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. **Stress.** v.10, n.4, p.326-31, 2007.

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

RONDINI, T. A. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. **Neuroscience**, v. 125, p.735-748, 2004.

ROSSBACH, U.L. Nandrolone-induced hippocampal phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs. **Biochem Biophys Res Commun.** v.357, n.4, p.1028-33, 2007.

ROTHMAN S.M.; OLNEY, J.W. Excitotoxicity and the NMDA receptor – still lethal after eight years. **Trends Neurosci.** v.18, p.57–58, 1995.

SANNE, J.L.; KRUEGER, K.E. - Expression of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction na in situ hibridization. **J Neurochem.** v.65, p.528-36, 1995.

SARRIEAU, A. et al. - Androgen binding sites in humana temporal cortex. **Neuroendocrinology.** v.51, p.713-6, 1998.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med.** v.78, p.3-13, 2000.

SCERBO, A.S.; KOLKO, D.J. Salivary testosterone and cortisol in disruptive children:relationship to aggressive, hyperactive, and internalizing behaviors. **J. Am. Acad.Child. Adolesc. Psychiatry.** v.33, p.1174–1184, 1994.

SCHÄNZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clin Chem.** v.42, n.7, p.1001–20, 1996.

SCHULTE, A.; ERNST, H.; PETERS, L. Induction of squamous cell carcinomas in the mouse lung after long-term inhalation of polycyclic aromatic hydrocarbon-rich exhausts. **Exp Toxicol Pathol.** v.4, p.415-421, 1993.

SHAHIDI, N.T. A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. **Clin Ther.** v.23, n.9. p.1355–1390, 2001.

SIEGEL, A. et al. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.23, p.359–389, 1999.

SILVA, A.C.J.S.R.; SÁ, M.F.S. Efeitos dos esteróides sexuais sobre o humor e a cognição. **Rev. de Psiquiatria Clínica.** v.33, n.2, p.60, 2013.

SIMERLY, R.B. et al. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology**. 76-95, 1990.

SJÖQVIST, F.; GARLE, M.; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **Lancet**; v.371, n.9627, p.1872–82, 2008.

SNYDER, P.J. Clinical Use of Androgens. **Ann Rev Med**. v.35, p. 207–17, 1984.

SOKOLOWSKI, K.; CORBIS J.G.; Wired for behaviors: From development to function of innate limbic system circuitry. **Frontiers in molecular neuroscience**. v.5, n. 55, 2012.

SPRITZER, M.D.; GALEA, L.A. Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. **Dev Neurobiol**. v.67, p.1321–1333, 2007.

STEENSLAND, P. et al. **Anabolic androgenic steroid affects social aggression and fear-related behaviors in male pairhoused rats**. *Horm Behav*. v.48, n.2, p. 216-224, 2005.

_____ Androgens. In: HANMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. p. 1635-48, 10th ed., USA: McGraw-Hill, 2001.

STEIN, S.T. Incompatibilities of preoperative medications. **Imprint**. v.20, n.4,p. 21-22, 1973.

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.

STRAWFORD, A. et al. Effects of nandrolone decanoate therapy in borderline hypogonadal men with HIV-associated weight loss. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. v.20, n.2, p.137-46, 1999.

SU. T. et al. Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. **JAMA**. v.269, n.21, p.2760-2764, 1993.

SVARE, B.B. Anabolic steroids and behavior: a preclinical research perspective. **NIDA Res Monographs**, v.102, p. 224–41, 1990.

SWANSON, L. M.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? **Trends in Neurosciences**, v. 21, p. 323-331, 1998.

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

THEIN, L.A.; THEIN, J.M.; LANDRY, G.L. Ergogenic aids. **Phys Ther**, v.75, p.426-38, 1995.

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

UZYCH, L. Anabolic-androgenic steroids and psychiatric-related effects: A review. **Can J Psychiatry**, v.37, n.1, p.23-8, 1992.

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.

VAN STRIEN, N.M.; CAPPAERT, N.L.; WITTER, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nat Rev Neurosci**, v.10, p.272-282, 2009.

VEENEMA, A.H.; NEUMANN, I.D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. **Brain Behav Evol**, v.70, p.274-285, 2007.

VEENEMA, A.H. et al. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Horm. Behav**, v.51, p.11-19, 2007.

VOCHTELOO, J.D.; KOOLHASS, J.M. Medial amygdala lesions in male rats reduce aggressive behavior: interference with experience. **Physiol. Behav**. v.41, p.99-102, 1987.

VOLAVKA J.; BILDER R.; NOLAN K. Catecholamines and aggression: The role of COMT and MAO polymorphisms. **Acad Sci**. v.1036, p.393-398, 2004.

WALKER, D.L.; TOUFEXIS, D.J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **Eur. J. Pharmacol**, v.463, p.199-216, 2003.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v.83, p.482-504, 1976.

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.

WEINECK, J. Fatores que influenciam a capacidade de desempenho esportivo. In: **Biologia do Esporte**, 7^a. ed., Manole: São Paulo. 2005. p.417- 544

WEILAND, N.G. Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. **Endocrinology**, v.131, p.662–668, 1992.

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

WILLIAMS, L.M. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. **J Neurosci**, v.26, n.36, p.9264-71, 2006.

WILSON, J.D. Androgens. In: GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed. Singapore: McGraw-Hill Book Co., p.1441-57, 1996.

 Androgen Abuse by Athletes. **Endocrine Reviews**. The Endocrine Society. Texas, USA, 1988.

WOOD, R.L. Reinforcing aspects of androgens. **Physiol. Behav.** v.83, p.279–289, 2004.

WOOD, R. L.; NEWMAN, S. W. Hormonal influence on neurons of the mating behavior pathway in male hamster. In: MICIVYCH, P. E.; HAMMER Jr, R. P. **Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones**. New York: Cambridge, p. 3-39, 1995.

WU, F.C.W. Endocrine aspects of anabolic steroids. **Clin Chem** v.43, n.7, p.1289-92, 1997.

YANG, P.; LONES, B.L.; HENDERSON L.P. Mechanisms of anabolic androgenic steroid modulation of GABAA receptors. **Neuropharmacology**. v.43, p.619–633, 2002.

YANG, S.H. et al. Testosterone increases neurotoxicity of glutamate in vitro and ischemia-reperfusion injury in an animal model. **J Appl Physiol.** v.92, n.1, p.195-201, 2002.

YESALIS, C.E.; BAHRKE, M.S. Anabolic-androgenic steroids. **Current Issues Sports Med;** v.19, n.5, p.326-40, 1995.

ZHAO, J. Oxandrolone blocks glucocorticoid signaling in an androgen receptor-dependent manner. **Steroids.** v.69, p.357-66, 2004.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de maio de 2013.

Prof. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 505/2013, intitulado “Análise quantitativa de corpos celulares de neurônios do hipotálamo, tálamo e amígdala de camundongos tratados com 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 da CEUA – Unifal-MG