

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - MG

DAUANDA KÉCIA SILVA

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO CÓRTEX CEREBRAL E DO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.**

ALFENAS/MG

2014

DAUANDA KÉCIA SILVA

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO CÓRTEX CEREBRAL E DO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS SOB O USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.**

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

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Costa Rossi Junior

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Esteves

ALFENAS/MG

2014

Silva, Dauanda Kécia.

Análise estereológica do córtex cerebral e do hipocampo de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes / Dauanda Kécia Silva, Alfenas, MG - 2014.

55 f. -

Orientador: Wagner Costa Rossi Junior.

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

Bibliografia.

1. Esteroides. 2. Córtex Cerebral. 3. Hipocampo. 4. Neurônios.
5. Camundongos. I. Rossi Junior, Wagner Costa. II. Título.

CDD: 616.8

DAUANDA KECIA SILVA

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO CÓRTEX CEREBRAL E
DO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
AO USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 07/31/2014

Prof. Wagner Costa Rossi Junior
Instituição: UNIFAL

Assinatura:



Prof. Fábio César Prodocimi
Instituição: UNIP

Assinatura:



Prof. Evelise Adina Soares
Instituição: UNIFAL

Assinatura:



**Dedico aos meus pais, Aparecida e Magno,
aos meus irmãos, Débora e Wagner e ao
meu marido, Rodrigo, pelo apoio
incondicional, amor e paciência.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento neste plano e por me guiar sempre na direção correta. Ao meu marido Rodrigo, por ser minha principal inspiração pessoal e profissional; pelo amor, pelo apoio incondicional e pela paciência sempre presente. Aos meus pais pelo alicerce bem construído, pelo amor, pelos conselhos e bons exemplos que sempre me direcionaram no caminho do bem. Aos meus irmãos Débora e Wagner por sempre apoiarem minhas decisões, por toda força e amor, e por serem meus segundos pais, com os quais pude contar em todos os momentos. Aos meus sobrinhos Sávio e Plínio, pelos sorrisos e por sempre me trazerem alegrias. A todos os meus amigos, pelo apoio, pelas boas risadas e pela presença constante nos momentos bons e ruins. Agradeço principalmente a minha amiga Júnia, pelo companheirismo, amizade e carinho de irmã. As minhas colegas de república, Cíntia e Luana, por tornarem os meus dias sempre mais divertidos e alegres.

Agradeço aos colegas e grandes amigos graduandos e pós-graduandos do laboratório de Anatomia pelo apoio e companheirismo: Ariane, Bruno, Débora, Fábio, Juliane, Luana, Melissa e Murilo. Agradeço também a todos os professores e funcionários do Departamento de Anatomia da UNIFAL-MG, em especial à Dona Cida e ao Pit pela alegre companhia e pelo auxílio sempre oferecido com muito carinho.

E por último, meu agradecimento especial é direcionado a duas pessoas muito importantes: Meu orientador, Prof. Dr. Wagner, por toda paciência, dedicação, confiança, atenção, por acreditar sempre na minha capacidade, por ter me acolhido com tanto carinho e me instruído tão brilhantemente durante a realização do nosso trabalho; e à minha coorientadora, Prof^a Dr^a Alessandra, carinhosamente chamada de “Alê” ou “Lê”, por ser minha grande inspiração desde o meu primeiro ano de graduação, quando percebi que queria ser igual a ela. Agradeço por sempre me apoiar, orientar e aconselhar por todo o caminho até aqui... Por ser tão amiga e por doar seus conhecimentos com tanta sabedoria e carinho. E por não medir esforços para que tudo dê certo sempre! A este casal brilhante e a todos os acima citados, muito obrigada!

Dauanda Kécia Silva.

RESUMO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona. Nas últimas décadas, a importância dada à aparência corporal cresceu drasticamente, assim como o consumo das chamadas "drogas da imagem corporal", onde se incluem os EAA. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do uso crônico dos EAA, observando sua influência na quantidade de células nervosas, nas áreas límbica, motora e sensitiva do córtex cerebral e nas áreas Ca1, Ca2 e Ca3 do hipocampo de camundongos. Foram utilizados, 32 camundongos machos da linhagem *Swiss*, divididos em 4 grupos (n=8): G1: Controle, G2: tratado com o anabolizante Durateston® (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona), G3: tratado com o anabolizante Deca Durabolin® (decanoato de nandrolona) e G4: tratado com os dois anabolizantes, concomitantemente. Os camundongos foram tratados durante dois (2) meses, com 83,3 mg/Kg/semana de Durateston® e 16,6 mg/Kg/semana de Deca Durabolin® e praticando natação três vezes por semana. Após a eutanásia, os encéfalos foram retirados, lavados e armazenados em formaldeído a 4%. Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais, coloração pelo violeta cresil e posterior análise das lâminas utilizando a metodologia de contagem aleatória simples. Os resultados mostram uma redução significativa no número de corpos de neurônios nas áreas límbica, sensitiva e motora do córtex cerebral e nas regiões Ca1 e Ca2 do hipocampo. Os resultados sugerem que o uso crônico de EAA pode ser prejudicial ao sistema nervoso, visto que a redução de corpos de neurônios pode trazer prejuízos estruturais e funcionais para o cérebro.

Palavras-chave: Esteroides. Córtex Cerebral. Hipocampo. Neurônios. Camundongos.

ABSTRACT

Anabolic androgenic steroids (AAS) are testosterone synthetic derivatives. In recent decades, the importance given to body image has grown dramatically, as well as the consumption of so-called "body image drugs", which include ASS. The aim of this study was to analyze the effects of AAS chronic use in the amount of limbic, motor, sensory and Ca1, Ca2, Ca3 hippocampal areas nerve cells of mice. Were used, 32 male mice divided into 4 groups (n=8): G1: control, G2: treated with anabolic steroid Durateston® (testosterone propionate, testosterone fempropionate, testosterone isocaprionate, testosterone decanoate), G3: treated with steroid anabolic Deca Durabolin® (nandrolone decanoate) and G4: treated with both steroids concomitantly. The mice were treated for two (2) months, receiving 83.3 mg / kg / week of Durateston® and 16.6 mg / kg / week of Deca Durabolin and swimming three times a week. After euthanasia their brains were removed, washed and stored in 4% formaldehyde. The fragments were processed according to standard histological procedures in conventional sequence; cresyl violet staining and subsequent analysis using to simple random count methodology. The results show a significant reduction in number of neuron bodies in limbic, motor and sensory areas of cerebral cortex and the hippocampus Ca1 and Ca2 areas. The results suggest that chronic use of AAS can be harmful to nervous system, since the reduction of neuron bodies can bring structural and functional damage to the brain.

Key words: Steroids. Cerebral Cortex. Hippocampus. Neurons. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Biotransformação da testosterona.....	15
Figura 2-	Mecanismo de ação dos androgênios na célula.....	16
Figura 3-	Distribuição de grupos de animais segundo substância administrada e exercício físico realizado.....	24
Figura 4-	Recipiente utilizado na realização da natação.....	26
Figura 5-	Cortes frontais do cérebro de um camundongo.....	27
Figura 6-	Área teste.....	28
Figura 7-	Equipamento utilizado na análise.....	29
Figura 8-	Fotomicrografias da área límbica.....	32
Figura 9-	Fotomicrografias da área motora.....	34
Figura 10-	Fotomicrografias da área sensitiva.....	36
Figura 11-	Fotomicrografias da área Ca1.....	38
Figura 12-	Fotomicrografias da área Ca2.....	40
Figura 13-	Fotomicrografias da área Ca3.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Quantificação de neurônios da área límbica no córtex cerebral dos animais do grupo controle e tratados.....	31
Gráfico 2-	Quantificação de neurônios da área motora no córtex cerebral dos animais do grupo controle e tratados.....	33
Gráfico 3-	Quantificação de neurônios da área sensitiva no córtex cerebral dos animais do grupo controle e tratados.....	35
Gráfico 4-	Quantificação de neurônios da área Ca1 no hipocampo dos animais do grupo controle e tratados.....	37
Gráfico 5-	Quantificação de neurônios da área Ca2 no hipocampo dos animais do grupo controle e tratados.....	39
Gráfico 6-	Quantificação de neurônios da área Ca3 no hipocampo dos animais do grupo controle e tratados.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área límbica no córtex cerebral dos animais.....	30
Tabela 2-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área límbica no córtex cerebral dos animais.....	32
Tabela 3-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área límbica no córtex cerebral dos animais.....	34
Tabela 4-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área Ca1 no hipocampo dos animais.....	37
Tabela 5-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área Ca2 no hipocampo dos animais.....	39
Tabela 6-	Quantidade de corpos celulares de neurônios da área Ca3 no hipocampo dos animais.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	HISTÓRICO DOS EAA.....	13
2.2	A TESTOSTERONA E OS EAA.....	14
2.3	O USO DE EAA E SEUS DERIVADOS.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	JUSTIFICATIVA.....	22
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1	PRINCÍPIOS ÉTICOS.....	23
5.2	ANIMAIS.....	23
5.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
5.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	24
5.5	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS ENCÉFALOS.....	26
5.6	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	26
5.7	ANÁLISE QUANTITATIVA DE REGIÕES DO CÉREBRO.....	27
5.8	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS.....	28
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6	RESULTADOS.....	30
6.1	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA LÍMBICA.....	30
6.2	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA MOTORA.....	32
6.3	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA SENSITIVA.....	34
6.4	HIPOCAMPO.....	36
6.4.1	Área Ca1.....	36
6.4.2	Área Ca2.....	38
6.4.3	Área Ca3.....	40
7	DISCUSSÃO.....	43
7.1	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA LÍMBICA.....	43
7.2	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA MOTORA.....	44
7.3	CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA SENSITIVA.....	45
7.4	HIPOCAMPO.....	47
8	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A testosterona e seus derivados estão incluídos no grupo dos hormônios esteroides e são produzidos naturalmente pelas gônadas (ovário e testículos) e córtex da suprarrenal. Várias regiões do corpo são influenciadas pelo efeito desses hormônios, tais como: os folículos pilosos, o fígado, os rins e os sistemas hematopoiético, reprodutor, muscular, ósseo, imune e nervoso central. Os efeitos desses hormônios são, geralmente, associados aos efeitos androgênicos (masculinização) e aos efeitos anabólicos, isto é, construção proteica nos músculos estriados e ossos (KICMAN, 2008).

No período da puberdade, os efeitos dos androgênios manifestam-se pelo crescimento da genitália externa masculina, desenvolvimento e início das atividades dos órgãos reprodutivos (próstata, glândulas seminais e bulbouretrais). As características sexuais secundárias também sofrem influência dos hormônios, apresentando-se com efeitos androgênicos, tais como: alargamento da laringe, levando ao engrossamento da voz; crescimento dos pêlos; aumento da atividade de glândulas sebáceas e efeitos no sistema nervoso central (aumento da libido e agressividade); além de efeitos anabólicos como, desenvolvimento do músculo estriado e osso, e aumento da estatura por crescimento das epífises dos ossos longos (KICMAN, 2008).

Clinicamente a testosterona é utilizada para avaliar o potencial de fertilidade masculina, falha renal, anemia aplástica, astenia com base na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no tratamento de pacientes em hemodiálise, osteoporose, dentre outras (TASGIN; LOK; DEMIR, 2011).

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona, utilizados para fins terapêuticos e fornecimento de potência anabólica com aumento ou não dos efeitos androgênicos (masculinização) (URHAUSEN; TORSTEN; WILFRIED, 2003).

Nas últimas décadas, a importância dada à aparência corporal cresceu drasticamente. O aparecimento de novas técnicas de cuidado e gerenciamento do corpo, como dietas, musculação e cirurgias estéticas, aumentaram ainda mais essa preocupação com a aparência. Tanto homens quanto mulheres investem cada vez mais tempo e recursos financeiros, na obtenção de bens e serviços voltados à construção e manutenção do corpo. Do mesmo modo que cresce a atenção voltada para o invólucro corporal, o consumo das chamadas "drogas da imagem corporal" onde se incluem os esteroides anabólicos androgênicos (EAA), também tem aumentado nos últimos anos (IRIART; CHAVES; ORLEAN, 2009).

Além de fins estéticos, o uso não médico descontrolado dos EAA por atletas para melhorar o desempenho físico é relatado. E não apenas por atletas profissionais em ambiente competitivo, sujeitos a controle de doping, mas cada vez mais em atletas amadores, que são frequentadores assíduos de academias de musculação em todo país (URHAUSEN; TORSTEN; WILFRIED, 2003).

Devido ao e aumento no número de usuários dos estereoides e por todos os agravos à saúde mental e física, como atrofia testicular e perda da libido, efeitos sobre o humor, hepatotoxicidade, tumores renais, doenças cardiovasculares, incluindo cardiomiopatia, efeitos virilizantes em mulheres e fusão das epífises ósseas (RITTER, 2012), aumentou-se a necessidade de estudar essas substâncias mais profundamente. Por este motivo, no presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos de dois esteroides anabolizantes no sistema nervoso central, através da análise morfoquantitativa de regiões do córtex cerebral e do hipocampo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o objetivo de tornar este capítulo mais didático, o mesmo foi dividido em três itens contendo informações referentes ao histórico dos EAA, à testosterona e aos efeitos dos EAA.

2.1 HISTÓRICO DOS EAA

No ano de 1889, o investigador Brown-Séquard injetou em si próprio um extrato preparado a partir de testículos de cães e porcos da Índia. Ele relatou que sentiu um reforço na vitalidade (KANAYAMA, 2010).

Várias décadas depois, em 1930, a testosterona foi isolada e caracterizada, e sua denominação foi usada pela primeira vez na Alemanha, onde: *testo* = testes, *ster* = esterol e *ona* = cetona. As células intersticiais do testículo (Células de Leydig) promovem a síntese da testosterona, que desempenha um papel importante na espermatogênese, desenvolvimento das características sexuais secundárias, liberação de gonadotrofinas e estimulação de síntese proteica (TASGIN; LOK; DEMIR, 2011).

Na década de 1950, a testosterona foi utilizada por via oral e injetável no tratamento de alguns tipos de anemia, em doenças com perda muscular e em pacientes pós-cirúrgicos com o objetivo de reduzir a atrofia muscular secundária (GHAPHERY, 1995).

Apesar de não detectáveis até 1975, desde os anos de 1950, os EAA são as substâncias mais administradas para aumentar a força muscular, sendo seguidos pela eritropoetina para melhoria da resistência física a partir de 1990 (CRUZ, 2012).

Em 1976, na Olimpíada de Montreal, foi iniciado o controle do uso de EAA, onde seis atletas foram punidos pelo uso dessas substâncias. O controle iniciou-se por razões éticas e devido aos efeitos nocivos à saúde como, por exemplo, complicações hepáticas, hipogonadismo e infertilidade. Desde então, essas substâncias tiveram o uso proibido pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) (CHRISTEN et al., 2012; CUNHA et al., 2006; MARQUES et al., 2003).

De acordo com o Ofício número 201, da Confederação Brasileira de Culturismo e Musculação (COFEN, 1998), no Brasil, há o uso indevido dessas drogas com finalidade

anabolizante assim como, substâncias destinadas ao uso veterinário, para equinos de competição, visando à mesma finalidade anabolizante. Essas drogas são vendidas livremente nas farmácias ou obtidas em farmácias de manipulação.

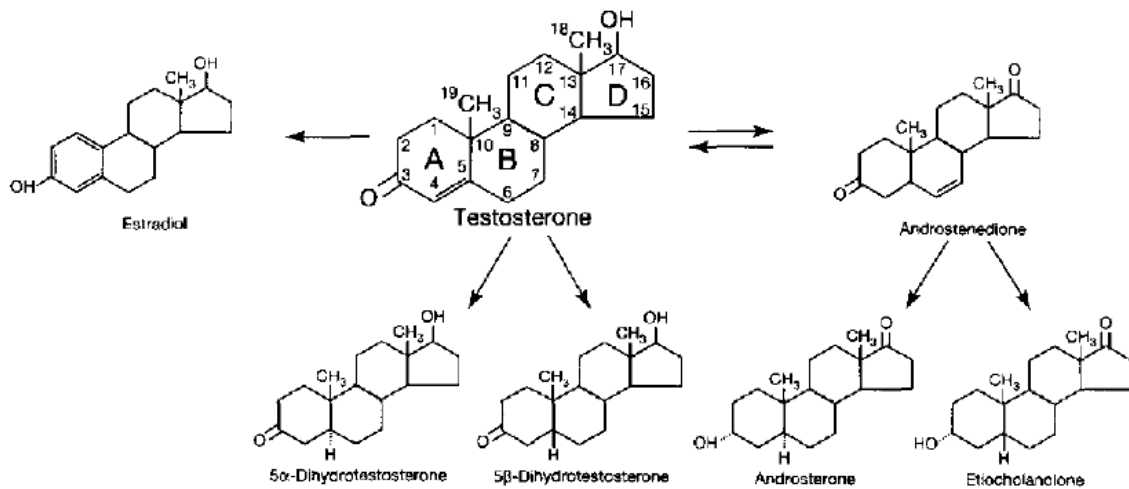
2.2 A TESTOSTERONA E OS EAA

O principal androgênio secretado nos homens é a testosterona. A síntese desta ocorre nas células intersticiais do testículo (células de Leydig) a partir da molécula de colesterol e pelo estímulo central do eixo hipotálamo-hipófise. O hipotálamo secreta GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), que por sua vez estimula a hipófise a secretar o LH (Hormônio Luteinizante), que atua nas células de Leydig (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Após sua secreção, a testosterona pode atuar diretamente nas células-alvo ou sofrer metabolização, originando os compostos inativos e os ativos como a diidrotestosterona (DHT). A reação que dá origem à diidrotestosterona é catalisada pela enzima 5α -redutase. E a reação que origina o estradiol, é catalisada pelo complexo enzimático aromatase (CYP19). A testosterona pode atuar diretamente nas células, ligando-se ao receptor androgênico, ou através da diidrotestosterona que se liga mais avidamente a esse receptor (GOODMAN & GILMAN, 2012).

No organismo, o primeiro passo no metabolismo da molécula de testosterona ocorre nos carbonos 4 e 5, originando derivados do tipo α e β com arranjo espacial distinto da molécula original. Como exemplo, tem-se a 5α -diidrotestosterona (DHT), que apresenta função androgênica e é originada por ação da 5α -redutase em órgãos como cérebro e órgãos reprodutores (Figura 1) (SHAHIDI, 2001).

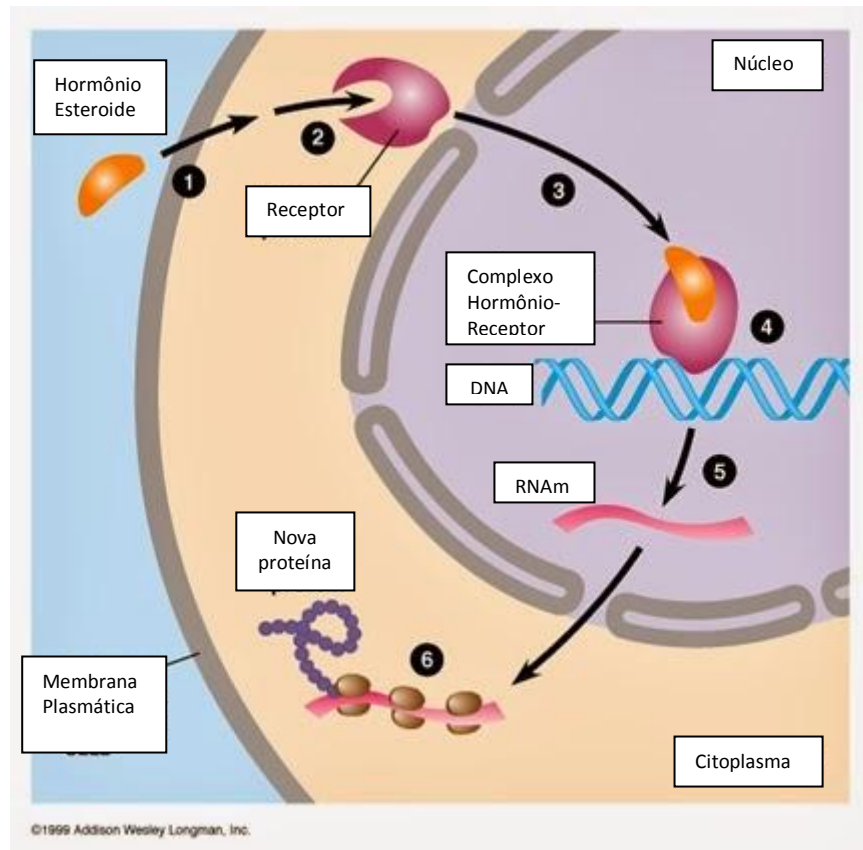
Figura 1- Biotransformação da testosterona



Fonte: SHAHIDI, 2001.

O receptor androgênico NR3A, é membro da superfamília de receptores nucleares e possui três domínios em sua estrutura espacial: um domínio aminoterminal, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação da testosterona e diidrotestosterona. Quando os androgênios se ligam ao receptor, ocorre uma alteração conformacional desse receptor, provocando uma translocação do complexo ligante-receptor até o núcleo da célula. Neste local, ocorre a ligação com o domínio de ligação ao DNA, resultando na estimulação dos genes para a transcrição de proteínas (Figura 2) (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Figura 2- Mecanismo de ação dos androgênios na célula.



Fonte: Addison Wesley Longman, Inc, 1999.

A testosterona possui dois mecanismos de ação, o mecanismo direto e o indireto. O mecanismo direto é mediado pela interação do hormônio com o receptor androgênico, que se encontra no citoplasma. Após a interação e translocação para regiões específicas do núcleo, ocorre a sinalização para síntese de proteínas. Já o mecanismo indireto não depende da interação testosterona-receptor androgênico, mas sim da interação com outros fatores tróficos e também pela interação dos EAA com o receptor de glicocorticoide, que atua inibindo a degradação de proteínas (VENÂNCIO et al., 2010).

Na síntese dos EAA ocorrem modificações conhecidas na molécula de testosterona, como alquilação na posição 17 e/ou a modificação da estrutura do anel. Essas modificações são feitas para que ocorra a produção de derivados com características mais anabólicas e menos androgênicas (masculinização) que a molécula original. A esterificação do grupo hidroxila com ácidos carboxílicos também aumenta a atividade dos esteroides, por causar aumento da ação por obtenção de propriedade lipofílica e, portanto, retenção no tecido adiposo. Os EAA exercem as suas funções através da ligação ao receptor androgênico (FRAGKAKI et al., 2009; GOODMAN; GILMAN, 2006; LUKAS, 1993).

Os esteróides anabolizantes de administração oral são submetidos a um processo de alquilação. Nesta reação a molécula de testosterona é modificada e um grupo metil (CH₃) ou etil (C₂H₅) é colocado na posição C17a. Deste modo, a alquilação causa um atraso na inativação hepática da testosterona e os produtos tornam-se oralmente ativos e mais resistentes ao metabolismo. Esse processo mantém as propriedades ativas dos esteróides, porém pode sobrecarregar o fígado (SHAHIDI, 2001).

As moléculas dos esteroides anabolizantes de administração injetável são mais solúveis devido à esterificação do grupo 17-hidroxila. O ácido usado para acidificar este grupo, determina a duração da ação anabólica. Ao retirar um hidrogênio e introduzir um grupo metil, ocorre à formação de 19-nortestosterona (nandrolona); e a esterificação do grupo 17-hidroxila da nandrolona com ácido decanóico, um ácido graxo de cadeia longa, provoca a formação do decanoato de nandrolona, que é liberado na circulação de forma lenta e exerce sua atividade anabólica em um período de 6 a 7 dias (SHAHIDI, 2001).

O Durateston®, um dos esteroides anabolizantes utilizados neste trabalho. Ele possui quatro ésteres diferentes da testosterona (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona), com diferentes durações de ação. Esses ésteres são hidrolisados na corrente sanguínea, resultando no hormônio natural testosterona. Uma dose única de Durateston aumenta a testosterona plasmática total de 24 a 48 horas após a administração, e os níveis retornam ao limite do nível inferior de normalidade em homens, dentro de 21 dias. A testosterona possui alta ligação (97%), não específica, às proteínas plasmáticas e à globulina transportadora de hormônio sexual em testes *in vitro*. A testosterona é metabolizada em diidrotestosterona e estradiol, que são metabolizados pelas vias normais de biotransformação. A excreção é feita principalmente na urina sob a forma de conjugados de etiocolanona e androsterona (DEF, 2014).

O Deca-Durabolin® possui o éster decanoato de nandrolona, que proporciona duração de ação de cerca de três semanas após a administração. Na corrente sanguínea, o éster decanoato é hidrolisado em nandrolona. Comparada com a testosterona, a nandrolona apresenta elevação da atividade anabólica e redução da atividade androgênica. A nandrolona sofre metabolização no fígado e é excretada na urina através de seus produtos 19-norandrosterona e 19-nortiocolanona (DEF, 2014).

2.3 O USO DE EAA E SEUS EFEITOS

Existem disponíveis no mercado mais de cem EAA, que variam muito em propriedades químicas e seus destinos metabólicos. Embora todos eles e seus metabólitos ligam-se ao receptor androgênico clássico, muitos após a aromatização, podem também exercer efeitos fisiológicos ligando-se aos receptores de estrogênio (PENATTI et al., 2011).

Atualmente os EAA têm sido cogitados para atuar na terapia antienvhecimento em indivíduos do sexo masculino, porque a testosterona atuaria melhorando a disposição física e emocional dos pacientes, demonstrando um efeito regenerador. No caso de politraumatismos e queimaduras, esse mesmo raciocínio é utilizado, visto que o EAA acelera o tempo de aparecimento da cicatriz (CECCHETTO; MORAES; FARIAS, 2012).

A administração de EAA não replica o complexo padrão flutuante de secreção de hormônios sexuais endógenos, interferindo no feedback negativo sobre o hipotálamo e a hipófise anterior. Isso causa inúmeros efeitos adversos, como atrofia testicular e perda da libido, efeitos sobre o humor, hepatotoxicidade, tumores renais, doenças cardiovasculares, incluindo cardiomiopatia, efeitos virilizantes em mulheres e fusão das epífises ósseas (RITTER, 2012).

Os efeitos exercidos pela testosterona são androgênicos e anabólicos em uma extensa variedade de tecidos alvo andrógeno-dependentes, como: o sistema reprodutor, o sistema nervoso central, a hipófise anterior, o rim, o fígado, os músculos e o coração (SHAHIDI, 2001).

Os EAA exercem efeitos estimulantes no cérebro, resultando em sensação de euforia e agressividade crescentes associados ao bom resultado muscular. A consequência disso é o uso de EAA por atletas de todos os níveis. O uso dos esteroides anabolizantes se dá de três formas:

- a) Ciclo: se refere a períodos de utilização contendo intervalos de tempo. Varia de quatro a dezoito semanas;
- b) Pirâmide: pequenas doses são administradas e gradualmente aumentam até um pico e reduzem novamente até o final do período;
- c) “*stacking*”: vários esteroides são utilizados ao mesmo tempo, onde o uso é alternado de acordo com a toxicidade.

É muito comum o uso dos três métodos e os EAA são administrados em doses supra fisiológicas, de até 500mg ou mais por dia, consumidos por semanas ou meses (AMBAR, 2008).

Além dos efeitos de aumento do volume muscular, os EAA também exibem efeitos anticatabólicos, uma propriedade importante para o aumento da massa muscular. O anticatabolismo ocorre através de inversão dos efeitos catabólicos dos glicocorticoides, que são secretados em resposta ao estresse ou como resultado da melhor utilização da proteína ingerida e elevação da retenção de nitrogênio. Além disso, os EAA causam elevação na capacidade aeróbica por estimular a eritropoiese (LUKAS, 1993).

O uso de EAA pode resultar em graves distúrbios físicos e psicológicos. Há evidências de um grande aumento no comportamento agressivo em animais de experimentação. Além disso, sabe-se que as mulheres apresentam maior susceptibilidade aos efeitos colaterais negativos de EAA, porém os mecanismos moleculares e circuitos neuronais envolvidos nos sintomas comportamentais em machos e fêmeas permanecem obscuros. Em fêmeas roedoras, os EAA estimulam comportamentos estereotipados masculinos, muito provavelmente pela remodelação da neurotransmissão em circuitos dimórficos centrais do sistema nervoso (AGIS-BALBOA et al., 2009).

Os EAA apresentam vários riscos para a saúde e inúmeros efeitos colaterais, tais como: peliose hepática (cistos contendo sangue no fígado), hipogonadismo, infertilidade devido ao baixo número na contagem de espermatozoides, morte cardíaca súbita, choque tóxico e cancro. Além disso, há sinais de comprometimento da saúde mental o que inclui agressividade e psicose. Porém, quando o uso é cessado o indivíduo pode apresentar quadro de depressão (CHRISTEN et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que os riscos do abuso crônico de EAA são mais pronunciados em fêmeas do que em machos. Assim como, em adolescentes de ambos os sexos são maiores que em adultos (PENATTI et al., 2011).

Trabalhos utilizando roedor macho demonstraram que os hormônios testiculares organizam circuitos comportamentais durante a adolescência. Além disso, o aumento do comportamento agressivo e sexual foi observado em ratos machos expostos a EAA (testosterona, nandrolona e estanozolol) na adolescência. Esses efeitos persistiram por várias semanas após a interrupção do tratamento. Isso sugere que o uso de EAA durante a adolescência, pode apresentar efeitos comportamentais mais pronunciados e duradouros que o uso na idade adulta (CUNNINGHAM; CLAIBORNE; MCGINNIS, 2007; SALAS-RAMIREZ; MONTALTO; SISK, 2010).

O uso crônico e suprafisiológico de esteroides anabolizantes, está associado à redução no número de corpos celulares de neurônios em regiões do córtex cerebral de camundongos (DAMIÃO et al., 2012).

Atualmente, nos Estados Unidos, a estimativa é que exista 3,5 milhões de usuários de esteroides anabolizantes. No Brasil o levantamento anual referente ao uso de drogas psicotrópicas pelos jovens brasileiros, nas principais capitais do país, demonstrou que dentre os usuários de psicotrópicos, aproximadamente, 2% deles já haviam feito uso de EAA (VENÂNCIO et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são descritos em dois itens, separados em objetivos gerais e específicos.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar os efeitos dos EAA em áreas do cérebro de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos do uso crônico dos anabolizantes Durateston® (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona) e Deca-durabolin® (decanoato de nandrolona), por meio de análise morfoquantitativa de regiões do córtex cerebral e do hipocampo.

Analisar quantitativamente o número de corpos celulares de neurônios em áreas do córtex cerebral (límbica, sensitiva e motora) e do hipocampo (Ca1, Ca2 e Ca3).

4 JUSTIFICATIVA

Devido ao grande crescimento do uso indevido de substâncias anabolizantes, registrado anualmente e, além disso, pela relativa escassez de estudos dos efeitos causados pelo uso crônico de tais substâncias, são requeridos mais estudos visando auxílio na orientação aos usuários dessas substâncias.

Os efeitos deletérios de alguns anabolizantes são conhecidos, mas não há relações entre as doses abusivas normalmente utilizadas nos “ciclos” de aplicação das academias brasileiras de musculação e do mundo com o verdadeiro perigo que estas pessoas correm.

O sistema nervoso central foi escolhido por se tratar de um sistema de extrema importância para o organismo como um todo, na manutenção e regulação de funções biológicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O capítulo referente ao Material e Métodos foi didaticamente dividido em nove itens.

5.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS

Antes de serem iniciados os experimentos, por razões éticas, o projeto referente ao presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, registro nº 496/2012.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados neste trabalho 32 camundongos machos da linhagem *Swiss*, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas UNIFAL- MG. Cada caixa continha apenas um animal. Eles foram alojados em caixas plásticas, retangulares, medindo 30x18x12cm (comprimento, largura e altura), contendo maravalha trocada a cada 2 dias. Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*”, mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro no qual o claro se iniciava às 7 horas.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro (4) grupos experimentais (n=8) como mostrado na figura 3:

Figura 3- Distribuição de grupos de animais segundo substância administrada e exercício físico realizado.

Grupos	Número de Animais	Substância Administrada	Dosagem	Exercício Físico
Grupo I	8 (oito)	Solução fisiológica (Grupo controle)	0,02 mL/semana	Natação
Grupo II	8 (oito)	Durateston®	83,3mg/Kg/semana	Natação
Grupo III	8 (oito)	Deca Durabolin®	16,6mg/Kg/semana	Natação
Grupo IV	8 (oito)	Durateston® + Deca Durabolin®	83,3mg/Kg/semana + 16,6mg/Kg/semana	Natação

Fonte: Do autor.

5.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O tratamento consistiu na administração de dois esteroides anabolizantes diferentes: Durateston® 250 mg (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona) e Deca-Durabolin® 50 mg (decanoato de

nandrolona). Os animais foram tratados durante dois meses (uso crônico) com 16,6 mg/Kg de Deca-Durabolin® e 83,3 mg/Kg de Durateston®, aplicadas uma vez por semana. As doses foram obtidas através de cálculos levando em consideração o uso abusivo de EAA pelos usuários, que corresponde a doses suprafisiológicas variando de 10 a 100 vezes maior que as doses terapêuticas (BROWER, 1993; CLARK; FAST, 1996), ou até 500 vezes maior (AMBAR, 2008).

O grupo que foi tratado com os dois esteroides, simultaneamente, recebeu essas doses de cada anabolizante em dias diferentes: Durateston® nas terças-feiras e Deca-Durabolin® nas quintas-feiras. A quantidade de 0,02 mL de cada anabolizante foi aplicada no quadrante inferior direito do abdome, por via intraperitoneal. Essa via de administração foi escolhida com o objetivo de aproveitamento máximo da concentração aplicada.

Os animais do grupo controle receberam 0,02 mL de solução salina, uma vez por semana, com o objetivo de mimetizar o estresse da aplicação sofrido pelos animais tratados com os esteroides.

Os animais também foram submetidos à natação, durante o período de aplicação, três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), para mimetizar o exercício físico realizado por alguns esportistas usuários de EAA.

A natação foi realizada em um recipiente de plástico, retangular, medindo 43x34x26cm (Figura 4), contendo água corrente em temperatura ambiente a 28 a 30°C. Eles eram colocados na água, onde permaneciam em natação por 5 minutos, 4 animais por vez, cada qual devidamente identificado na cauda. A natação foi monitorada com o objetivo de manter os animais em constante movimento, evitando com que eles boiassem na água. Após este período de tempo, os animais eram retirados da água, secos com o auxílio de uma toalha limpa e seca e colocados de volta em suas respectivas caixas.

Figura 4- Recipiente utilizado na realização da natação.



Fonte: Do autor.

5.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DOS ENCÉFALOS

Os animais foram eutanasiados por meio de overdose do anestésico Halotano® (2-bromo-2-cloro-1,1, 1-trifluoretano) e seus encéfalos foram removidos, lavados em água corrente e armazenados em recipientes de vidro contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1M. Os encéfalos permaneceram imersos nesta solução fixadora por 24 horas, com o objetivo de manter as características originais do tecido no momento do óbito.

5.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

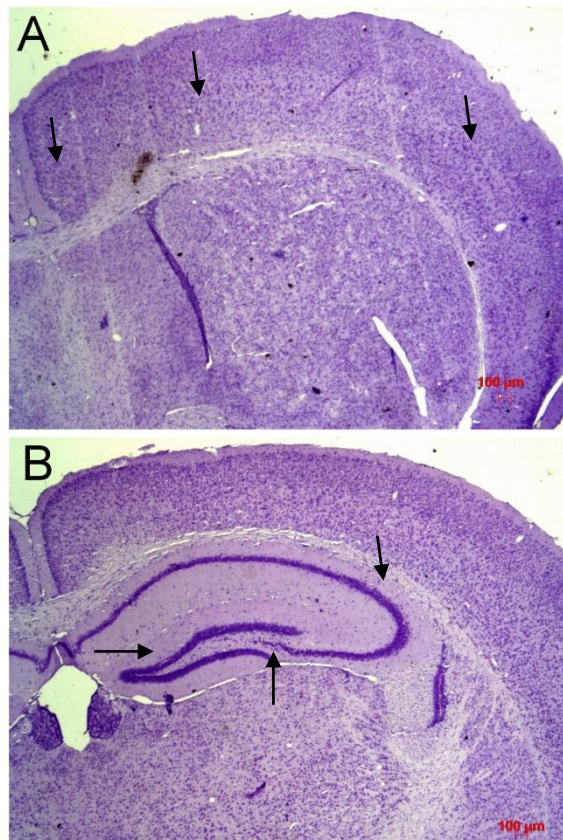
Os fragmentos dos encéfalos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: gradual desidratação em álcool (70%, 80%, 90%, 100%), diafanização em xilol (xilol I e xilol II) e inclusão em parafina (parafinas I, II e III). Cada região foi emblocada e cortada com espessura de 7 μ m em micrótomo Lupe® e coradas com violeta cresil para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar a forte marcação individual das células, para posterior

contagem. A espessura do corte possibilita afirmar, que estão sendo quantificadas as células na região analisada.

5.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DE REGIÕES DO CÉREBRO

Foi feita análise quantitativa das seguintes áreas do cérebro: Áreas límbica, motora e sensitiva, localizadas no córtex cerebral e áreas Ca1, Ca2 e Ca3, localizadas no hipocampo. Para cada área do córtex cerebral e hipocampo, quantificou-se três regiões distintas. A quantificação de cada área foi feita em triplicata e abrangendo ambos os hemisférios cerebrais (Figura 5).

Figura 5- Cortes frontais do cérebro de um camundongo.



Nota: Em A as setas mostram áreas corticais (Da esquerda para a direita: área límbica, área motora e área sensitiva); em B, as áreas hipocámpais (Da esquerda para a direita: Ca1, Ca3 e Ca2).

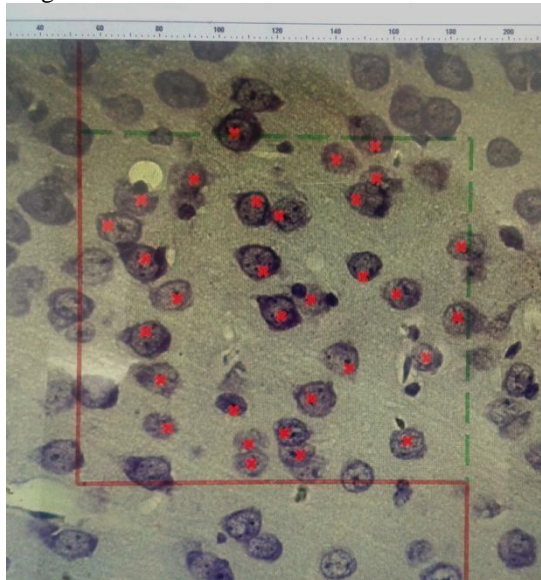
Fonte: Do autor.

5.8 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Para a estimativa da densidade por área de corpos celulares de neurônios, utilizou-se a metodologia de contagem aleatória simples (MANDARIN-DE-LACERDA, 1994; MANDARIN-DE-LACERDA, 2003; PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1995; WEST, 1993a; WEST, 1993b). Neste método, utilizou-se 3 cortes semiseriados de cada região (3 cortes do córtex cerebral e 3 cortes do hipocampo) por animal, nos quais se adquiriu 3 campos microscópicos de cada uma das 6 áreas (áreas límbica, sensitiva e motora do córtex; e áreas Ca1, Ca2 e Ca3 do hipocampo). Considerando ambos os hemisférios cerebrais e as 6 regiões analisadas, totalizaram-se setenta e duas (72) áreas quantificadas por animal. Como referência para a correta localização das áreas, consultou-se um atlas de coordenadas estereotaxicas do cérebro de camundongos (FRANKLIN; PAXINOS, 2007).

Nestas áreas, marcamos somente os perfis dos corpos celulares de neurônios que se encontram dispostos dentro da área teste e na linha de inclusão (linha verde), excluindo as células nas linhas contínuas em vermelho (Figura 6). Desta forma, aferimos o número de células por área contada, e não o número total dessas células no córtex cerebral e hipocampo.

Figura 6- Área teste



Fonte: Do autor.

O equipamento utilizado para a análise foi um computador acoplado a um microscópio binocular modelo Axio Scope A.1, uma câmera de vídeo e um software para análise de imagem modelo Axiovision Rel. 4.8.2 e Axiovision 4 Module Interactive Mensuerement da marca Carl Zeiss® (Figura 7).

Figura 7: Equipamento utilizado na análise.



Fonte: Do autor.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos valores obtidos na quantificação, foram realizados os testes de Análise de Variância, para verificar a presença de interações significativas entre os grupos e os esteroides, e o Teste de Tukey para discriminar as diferenças e/ou igualdades entre as médias avaliadas. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software Graphpad prism 5®.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos referem-se à quantificação de corpos celulares de neurônios nos quatro grupos tratados. Após a quantificação os valores foram analisados estatisticamente, utilizando o teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Pode-se observar a seguir que, em quase todas as áreas analisadas, o uso dos esteroides está associado ao menor número de neurônios.

6.1 CÓRTEX CEREBRAL - ÁREA LÍMBICA

A tabela 2 mostra as médias e desvio padrão de corpos celulares de neurônios na área límbica do córtex cerebral dos animais. É possível observar que o grupo I, controle, exibiu maior quantidade média de neurônios quando comparado aos demais grupos. Os animais tratados com o decanoato de nandrolona (grupo III) exibiram uma quantidade média inferior que o grupo controle e o grupo tratado com ambos os esteroides (grupo IV) demonstrou uma quantidade de neurônios ainda menor em relação aos demais.

Tabela 1– Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área límbica do córtex cerebral dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	DesvPad
GI	23,72	3,39
GII	21,90	2,06
GIII	19,87	1,69
GIV	16,79	1,05

Fonte: Do autor.

O gráfico 1 representa esquematicamente, os resultados obtidos através da análise morfoquantitativa de corpos celulares de neurônios na área límbica do córtex cerebral de camundongos machos.

Gráfico 1- Quantificação de neurônios da área límbica no córtex cerebral dos camundongos do grupo controle e tratados.

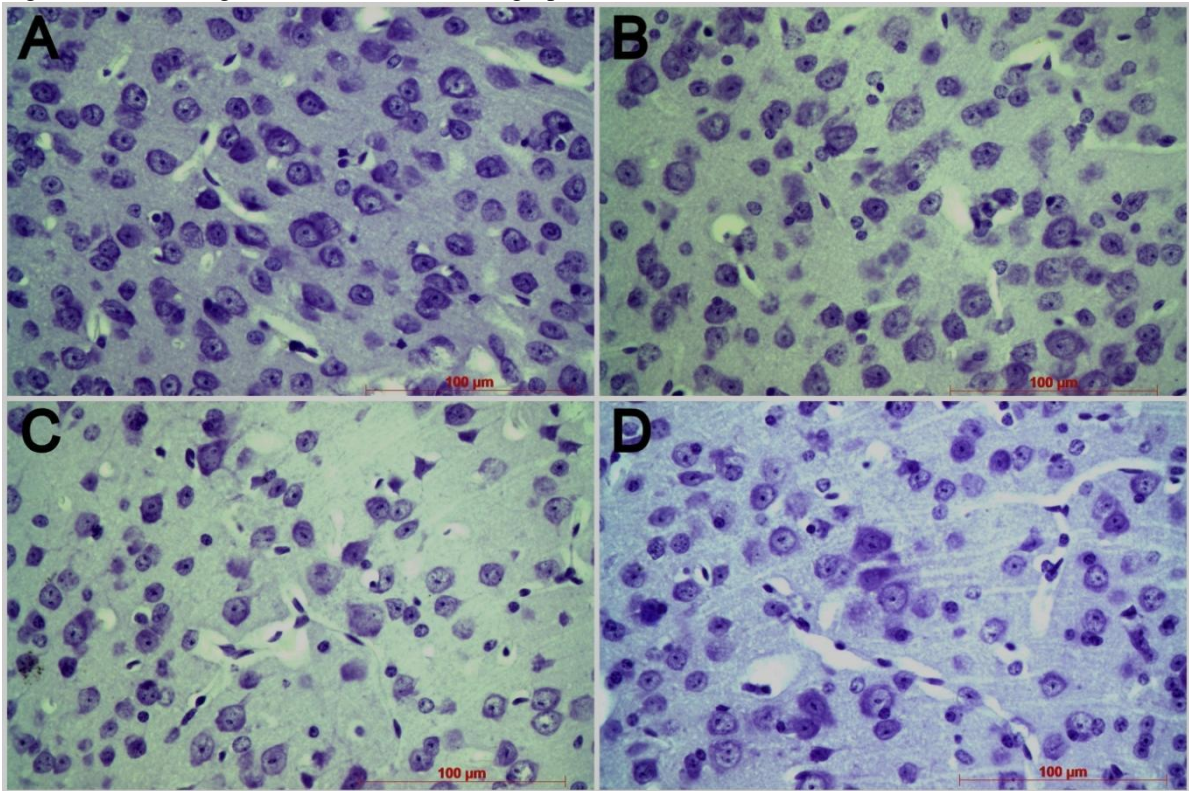


Nota: Colunas que possuem a mesma letra apresentam diferenças estatísticas entre elas. Sendo a e b = $p < 0,0001$ e c = $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

A figura 8 representa as fotografias referentes à quantificação da área límbica. Pode-se notar que a menor quantidade de neurônios nos grupos III e IV é evidente quando comparados com o grupo I.

Figura 8- Fotomicrografias da área límbica dos grupos tratados.



Nota: A: grupo I, B: grupo II, C: grupo III e D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

6.2 CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA MOTORA

A tabela 3 mostra as médias de corpos celulares de neurônios na área motora do córtex cerebral dos animais. É possível observar que os animais do grupo I, controle, exibiram uma quantidade média de neurônios superior quando comparado aos demais grupos.

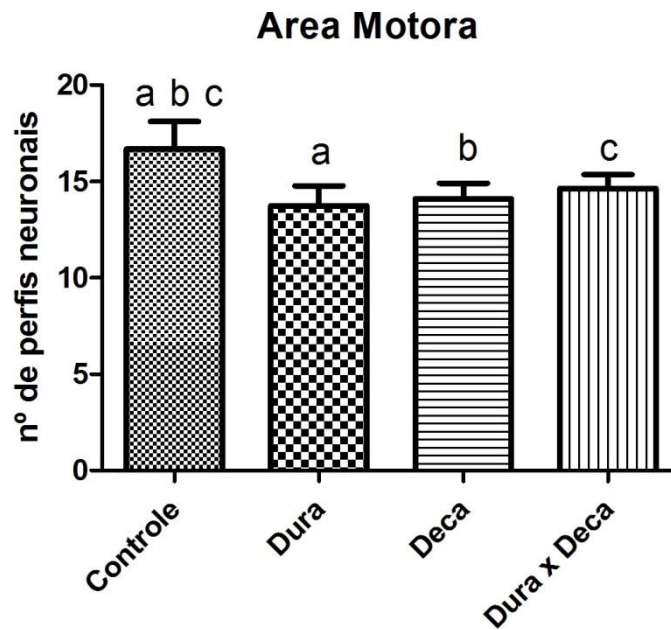
Tabela 2 – Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área motora do córtex cerebral dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	DesvPad
GI	16,67	2,68
GII	13,73	1,96
GIII	14,11	1,5
GIV	14,63	1,36

Fonte: Do autor.

O gráfico 2 ilustra os resultados obtidos na quantificação da área motora.

Gráfico 2- Quantificação de neurônios da área motora no córtex cerebral dos camundongos do grupo controle e tratados.

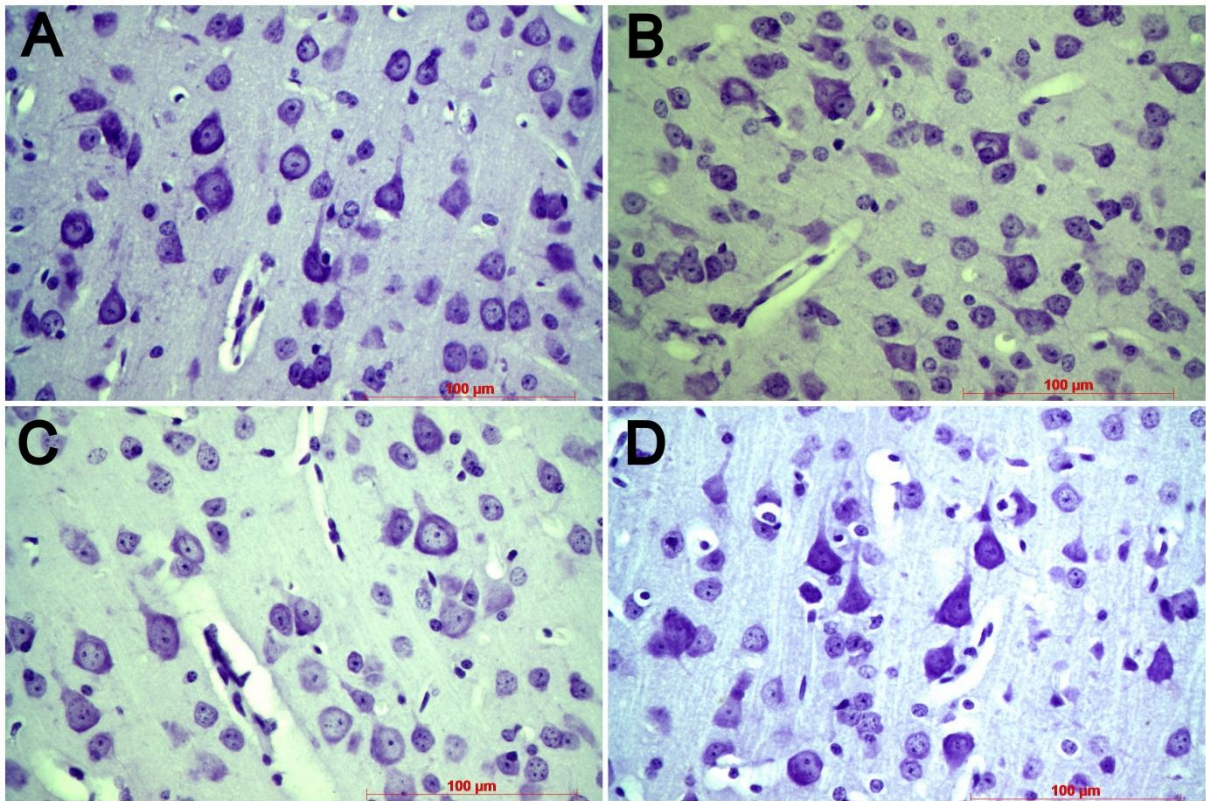


Nota: Colunas que possuem a mesma letra apresentam diferenças estatísticas entre elas. Sendo a = $p < 0,0001$; b = $p < 0,001$ e c = $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

A figura 9 representa as fotografias referentes à quantificação da área motora. É possível observar que o grupo controle exibe maior quantidade de células que os outros grupos.

Figura 9- Fotomicrografias da área motora dos grupos tratados.



Nota: A: grupo I, B: grupo II, C: grupo III e D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

6.3 CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA SENSITIVA

Na tabela 3, as médias de corpos celulares de neurônios na área sensitiva do córtex cerebral dos animais são observadas. É possível notar que os animais do grupo I, controle, exibiram uma quantidade média de neurônios superior quando comparado aos demais grupos.

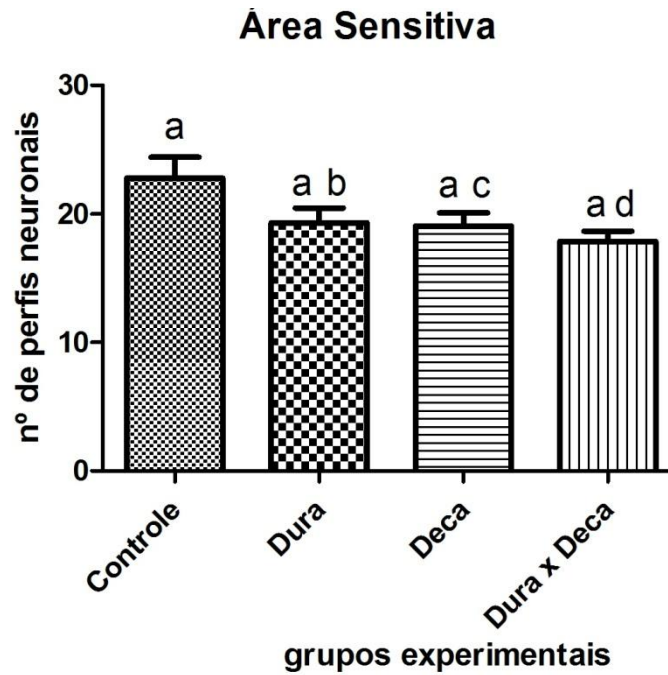
Tabela 3 – Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área sensitiva do córtex cerebral dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	DesvPad
GI	22,79	3,04
GII	19,32	2,15
GIII	19,05	1,94
GIV	17,87	1,51

Fonte: Do autor.

O gráfico 3 representa esquematicamente os resultados obtidos através da análise morfoquantitativa de corpos celulares de neurônios na área sensitiva do córtex cerebral de camundongos machos.

Gráfico 3- Quantificação de neurônios da área sensitiva no córtex cerebral dos camundongos do grupo controle e tratados.

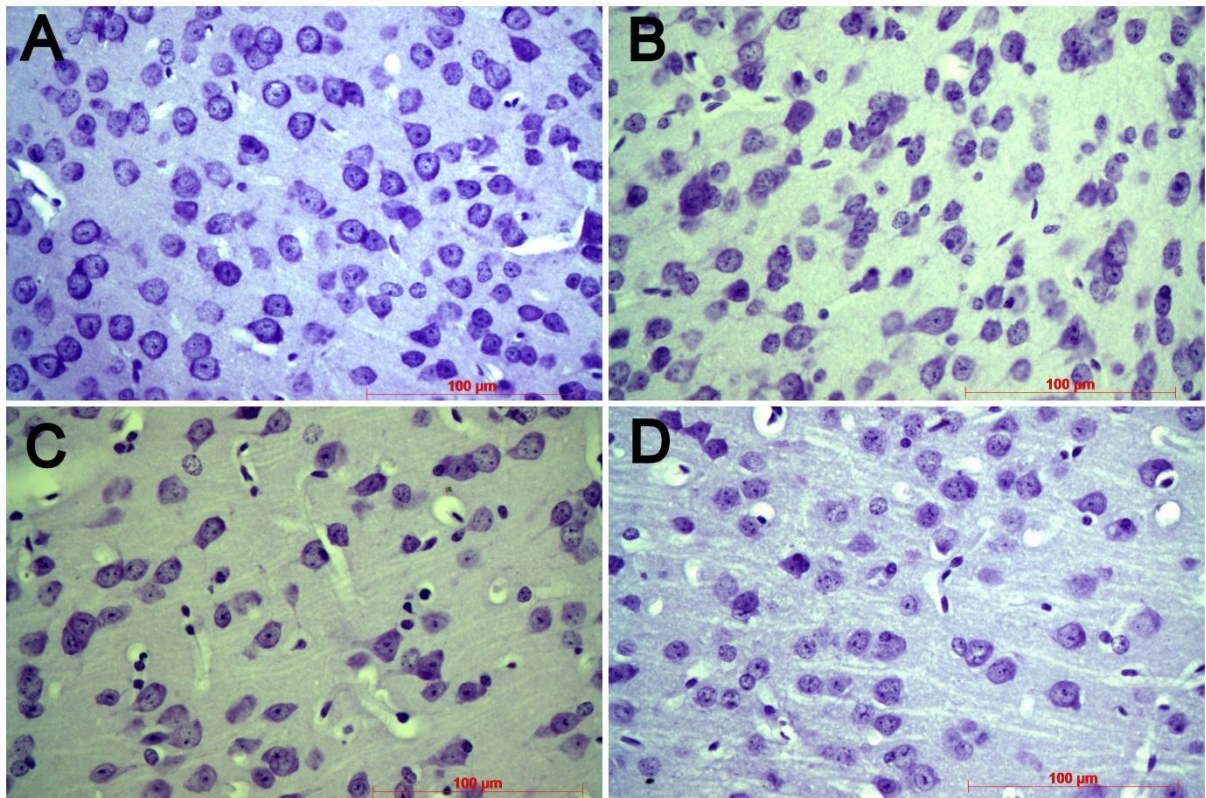


Nota: Colunas que possuem a mesma letra apresentam diferenças estatísticas entre elas. Sendo $a = p < 0,0001$

Fonte: Do autor.

A figura 10 representa as fotografias referentes à quantificação da área sensitiva. É possível notar a menor quantidade de neurônios quando comparados com a fotografia referente ao grupo controle.

Figura 10- Fotomicrografias da área sensitiva dos grupos tratados.



Nota: A: grupo I, B: grupo II, C: grupo III e D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

6.4 HIPOCAMPO

Este item se refere aos resultados referentes às áreas Ca1, Ca2 e Ca3 do hipocampo. A descrição desses resultados foi organizada em três itens.

6.4.1 Área Ca1

A tabela 4 mostra as médias de corpos celulares de neurônios da área Ca1 do hipocampo dos animais dos grupos I, II, III e IV. Observa-se que os três grupos tratados com esteroides demonstraram uma quantidade inferior de corpos de neurônios na Área Ca1, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$).

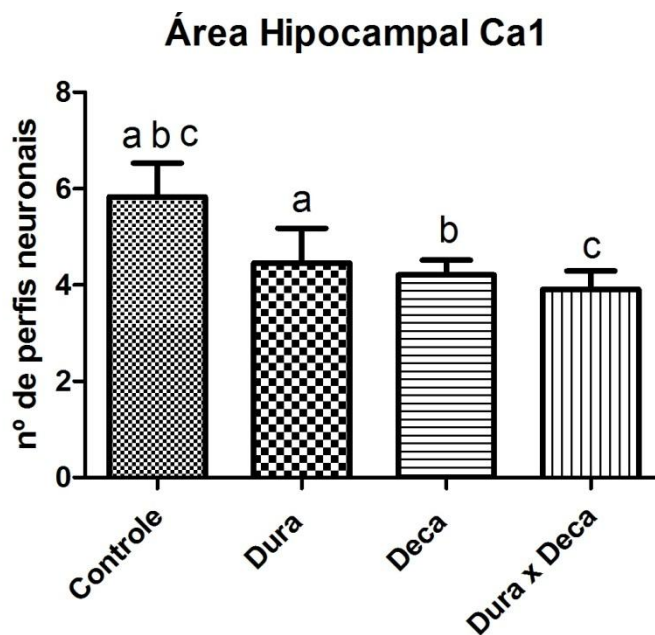
Tabela 4– Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área Ca1 do hipocampo dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	DesvPad
GI	5,83	1,32
GII	4,46	1,35
GIII	4,21	0,58
GIV	0,71	0,71

Fonte: Do autor.

O gráfico 4 mostra os resultados obtidos através da análise morfoquantitativa no hipocampo de camundongos machos. Fica claro que não houve diferenças quanto ao número de corpos celulares de neurônios quando do uso de EAA.

Gráfico 3- Quantificação de neurônios da área Ca1 no hipocampo dos camundongos do grupo controle e tratados.

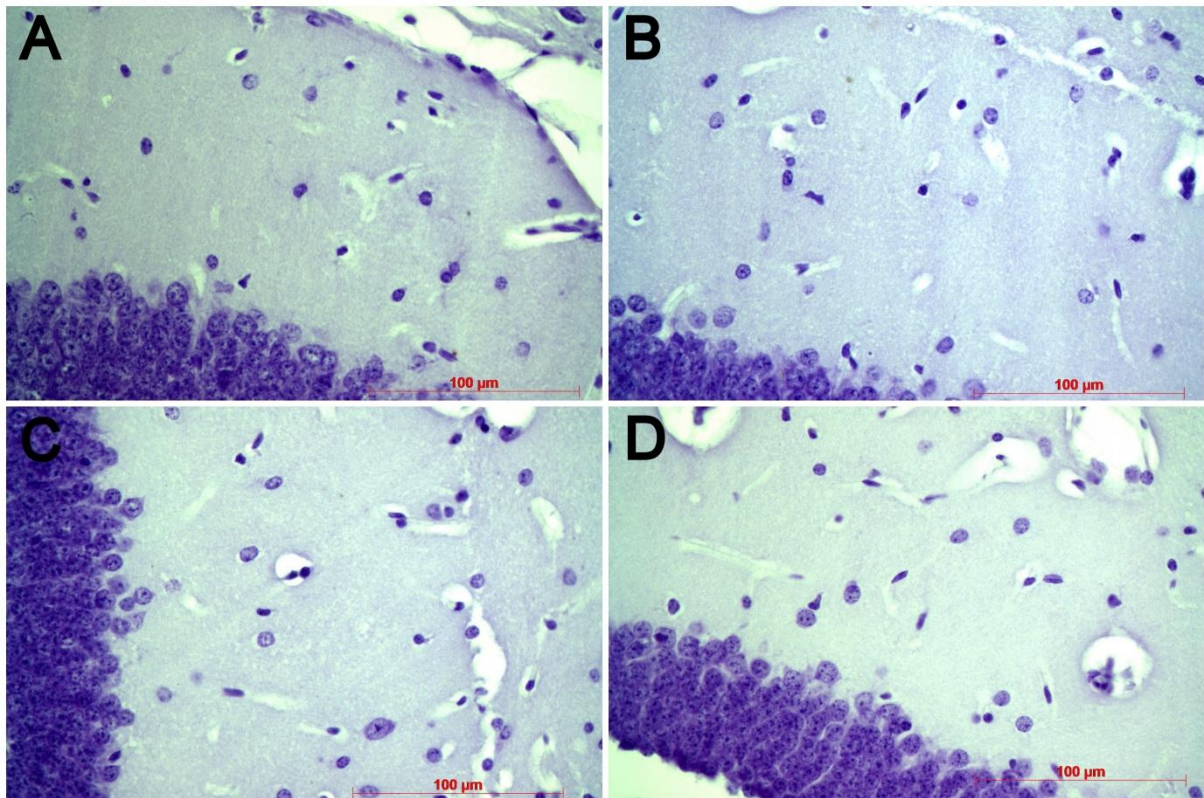


Nota: Colunas que possuem a mesma letra apresentam diferenças estatísticas entre elas. Sendo a = $p < 0,001$; b e c = $p < 0,0001$.

Fonte: Do autor.

A figura 11 representa as fotografias referentes à quantificação da área Ca1 do hipocampo.

Figura 11- Fotomicrografias da área Ca1 no hipocampo dos grupos tratados.



Nota: A: grupo I, B: grupo II, C: grupo III e D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

6.4.2 Área Ca2

A tabela 5 mostra as médias de corpos celulares de neurônios da área Ca2 do hipocampo dos animais dos grupos I, II, III e IV. Observa-se que o grupo I, controle, exibiu maior quantidade média de neurônios quando comparado aos demais grupos. Os animais tratados com o decanoato de nandrolona (grupo III) exibiram uma quantidade média inferior que o grupo controle e o grupo tratado com ambos os esteroides (grupo IV) demonstrou uma quantidade de neurônios ainda menor em relação aos demais.

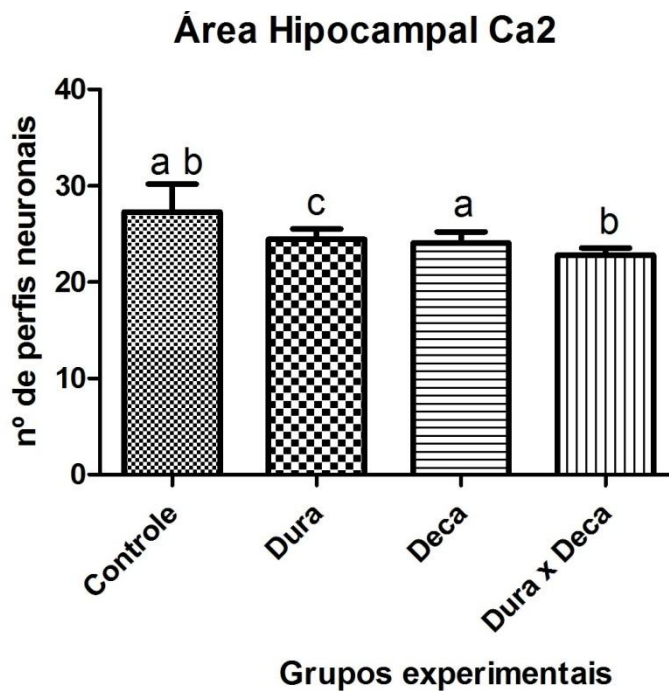
Tabela 5 – Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área Ca2 do hipocampo dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	Desv Pad
GI	27,29	5,44
GII	24,46	1,98
GIII	24,06	2,17
GIV	22,83	1,35

Fonte: Do autor.

O gráfico 5 mostra os resultados obtidos através da análise morfoquantitativa da área Ca2 do hipocampo de camundongos machos, demonstrando que os grupos III e IV exibiram menor quantidade de neurônios que o grupo controle.

Gráfico 5- Quantificação de neurônios da área Ca2 no hipocampo dos camundongos do grupo controle e tratados.

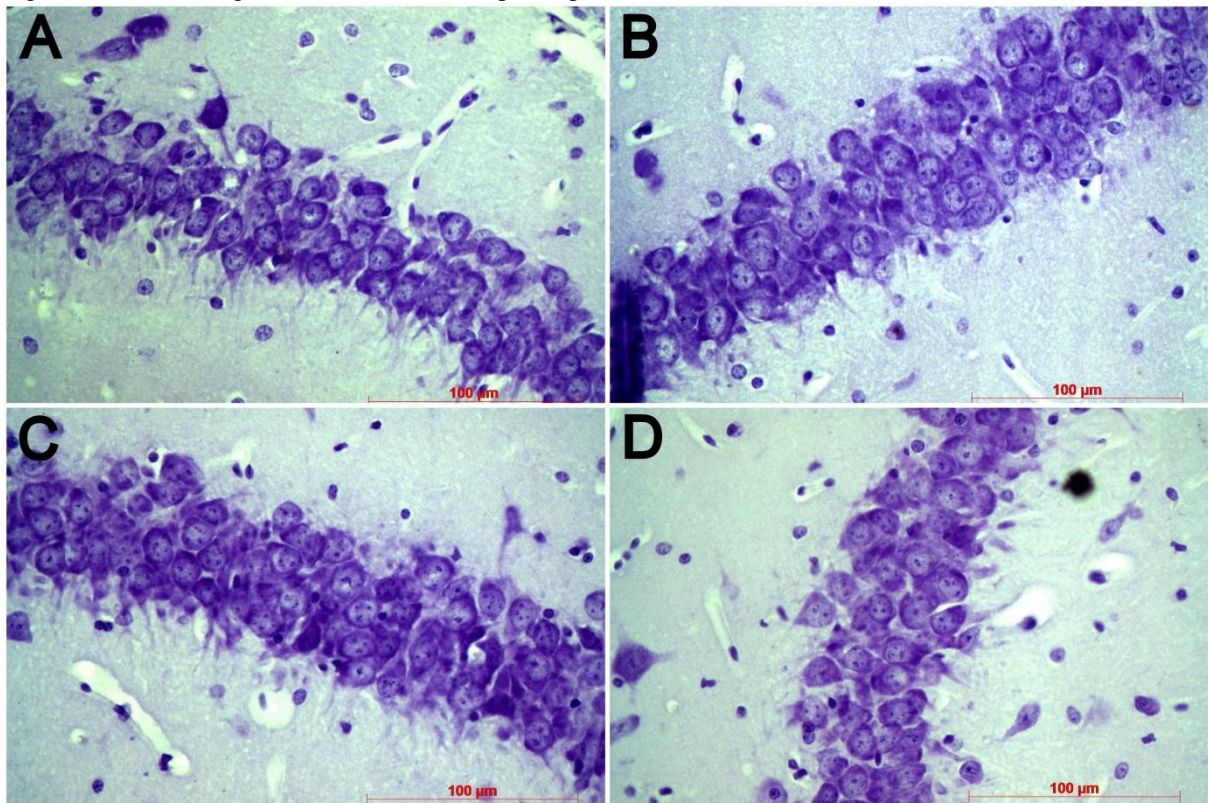


Nota: Colunas que possuem a mesma letra apresentam diferenças estatísticas entre elas. Sendo a = $p < 0,05$ e b = $p < 0,01$.

Fonte: Do autor.

A figura 12 representa as fotografias referentes à quantificação da área Ca2 do hipocampo.

Figura 12- Fotomicrografias da área Ca2 do hipocampo dos animais.



Nota: A: grupo I, B: grupo II, C: grupo III e D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

6.4.3. Área Ca3

A tabela 6 mostra as médias de corpos celulares de neurônios da área Ca3 do hipocampo dos animais dos grupos I, II, III e IV. Observa-se que não existem diferenças estatísticas nos valores médios de corpos de neurônios entre os grupos.

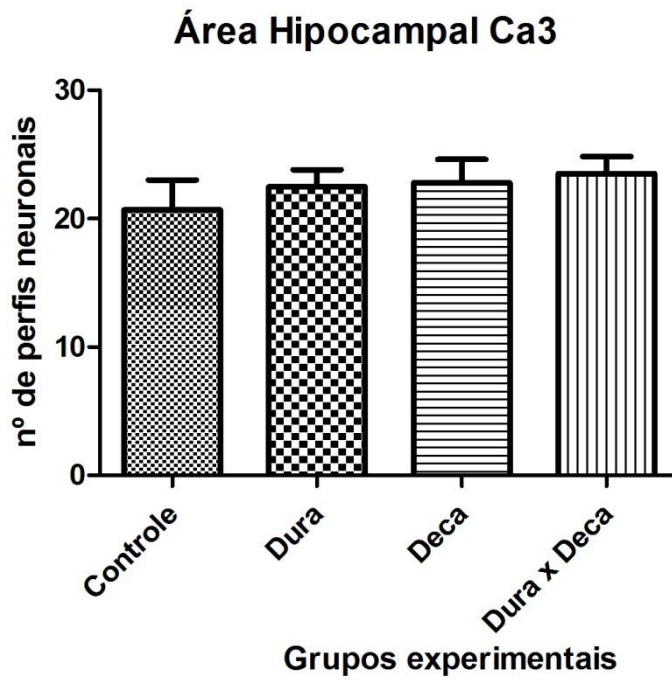
Tabela 6 – Quantidade de corpos celulares de neurônios e desvio padrão da área Ca3 do hipocampo dos animais do grupo controle e grupos tratados.

Grupos	Média	Desv Pad
GI	20,68	4,37
GII	22,50	2,47
GIII	22,79	3,41
GIV	23,52	2,49

Fonte: Do autor.

O gráfico 6 mostra os resultados obtidos através da análise morfoquantitativa da área Ca3 do hipocampo de camundongos machos. Nesta área, o uso de EAA não está associado a nenhuma alteração quantitativa.

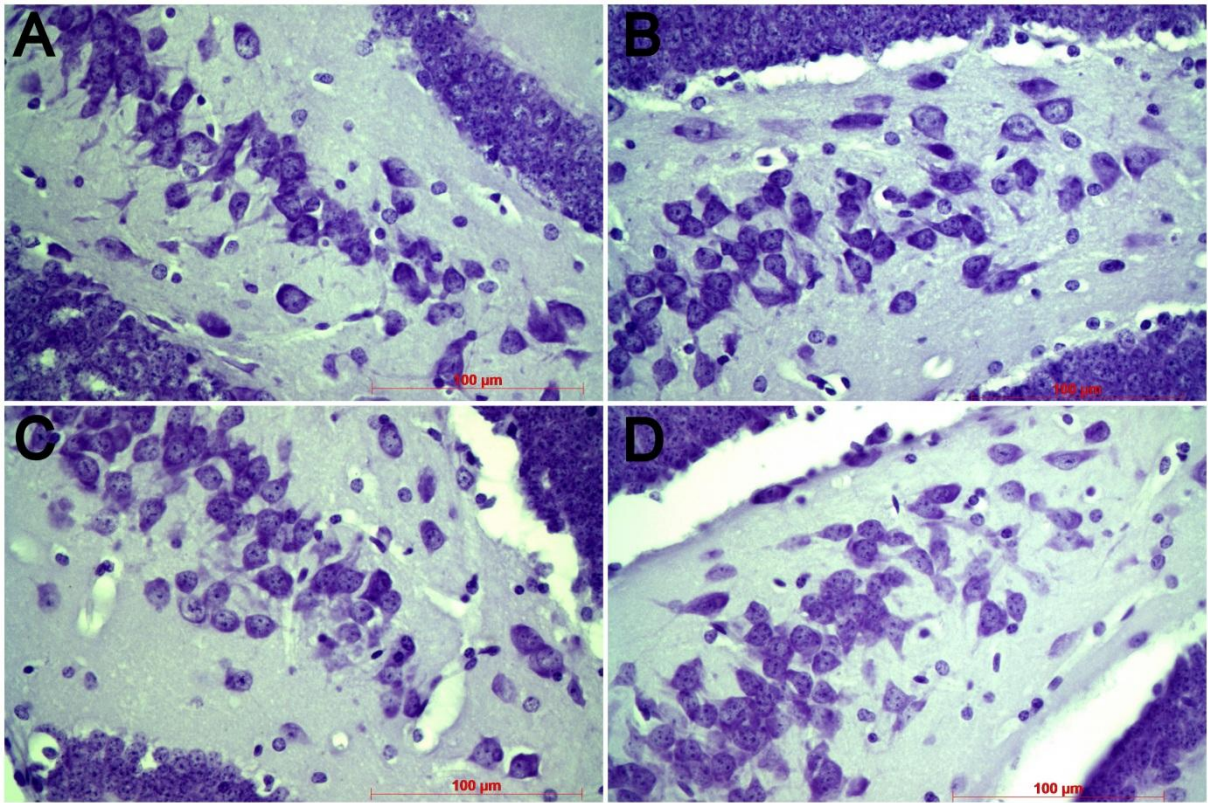
Gráfico 6- Quantificação de neurônios da área Ca3 no hipocampo dos camundongos do grupo controle e tratados.



Fonte: Do autor.

A figura 13 representa as fotografias referentes à quantificação da área Ca3 do hipocampo.

Figura 13- Fotomicrografias da área Ca3 do hipocampo dos animais.



Nota: Em A: grupo I, em B: grupo II, em C: grupo III e em D: grupo IV (aumento de 400x).

Fonte: Do autor.

7 DISCUSSÃO

Por questões didáticas este capítulo foi dividido em quatro itens referentes à discussão das áreas corticais e do hipocampo.

7.1 CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA LÍMBICA

O sistema límbico tem como estruturas principais os giros corticais, os núcleos de substância cinzenta e tratos de substância branca dispostos nas superfícies mediais de ambos os hemisférios e em torno de III ventrículo que, funcionalmente, se relacionam com os instintos, emoções e memória, e através do hipotálamo, com a manutenção da homeostase (RIBAS, 2007).

Além do papel no controle comportamental, o sistema límbico é responsável por controlar condições internas do corpo como a temperatura, osmolaridade, sensação de fome, sede e controle do peso. Essas funções internas são chamadas de *funções vegetativas* do cérebro e seu controle está diretamente relacionado com o comportamento (GUYTON; HALL, 2011; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

A porção menos conhecida do sistema límbico é o anel do córtex cerebral, o córtex límbico (lobo límbico), que está situado ao redor das estruturas límbicas subcorticais. Esse córtex funciona como uma zona de transição, pela qual, sinais são transmitidos do restante do córtex límbico e também na direção contrária. O córtex límbico é uma área associativa cerebral de controle do comportamento (GUYTON; HALL, 2011). Portanto, danos desta região associados ao uso indevido de EAA, podem causar prejuízos comportamentais associados a distúrbios do humor como agressividade (ROSSBACH, 2007).

Alguns pacientes são acometidos por distúrbios comportamentais e emocionais, que podem refletir o envolvimento do córtex límbico, amígdala, tálamo e vários sistemas monoaminérgicos que se projetam para o córtex do hipocampo (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Os EAA, de modo geral, possuem maior atividade anabólica e menor atividade androgênica (FRAGKAKI et al., 2009, GOODMAN; GILMAN, 2006, LUKAS, 1993). A nandrolona também possui os derivados 5α e 5β , porém em comparação com a testosterona,

ela possui atividade anabólica muito elevada e atividade androgênica reduzida (DEF, 2014; AMBAR, 2008). Sabendo-se que o Durateston® tem como princípio ativo os derivados da testosterona, acredita-se que ele possua menor atividade anabólica quando comparado ao Deca-durabolin®, que tem o decanoato de nandrolona como princípio ativo (DEF, 2014). Considerando-se que regiões do córtex cerebral e hipocampo possuem alta concentração de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores androgênicos, e que a diidrotestosterona (DHT) aumenta a ligação do glutamato ao receptor NMDA (LE GREVES, et. al., 1997; ROSSBACH, 2007)., então pode-se sugerir que maior parte da testosterona/DHT fornecida pelo Durateston® tenha sido consumida no auxílio com a ligação do glutamato ao receptor, deixando de atuar no receptor androgênico. Isso poderia explicar a menor redução de neurônios do grupo tratado pelo Durateston® (grupo II). Observando-se os resultados do grupo IV o mesmo raciocínio é realizado, pois ao ser utilizado para outro fim, acreditamos que o Durateston® deixou grande parte dos receptores androgênicos livres para o decanoato de nandrolona atuar, possivelmente causando maiores danos e levando à morte das células do córtex límbico.

Ainda que os animais tratados com Durateston® (grupo II) não exibiram diferenças estatísticas quando comparados ao controle na área límbica, ao observar a tabela 2 pode-se notar que a média de neurônios deste grupo é inferior à média de neurônios do grupo controle. Ou seja, mesmo que o resultado do grupo II não tenha se mostrado estatisticamente significativo, é visível a diminuição de corpos de neurônios nos valores médios, sugerindo que neste grupo também ocorreram danos aos neurônios mesmo que não tão pronunciados como nos grupos III e IV. Devido a isso, acreditamos que se o animal fosse tratado por um período de tempo mais prolongado, a diminuição de corpos celulares de neurônios seria ainda maior, tornando-se significativa estatisticamente.

7. 2 CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA MOTORA

O córtex motor é caracterizado como isocórtex heterotípico agranular e é composto por células piramidais gigantes. As principais conexões aferentes da área motora são com o tálamo, que recebe informações do cerebelo (MACHADO, 2006; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Os sinais motores são transmitidos diretamente do córtex para a medula espinal. A informação sensorial é integrada em todos os níveis do sistema nervoso e resulta em respostas motoras adequadas. A informação tem início na medula espinal e se estende para o tronco cerebral, com respostas mais complexas e por fim se estendem ao prosencéfalo, onde habilidades musculares mais complexas são controladas. A excitação de um único neurônio do córtex motor geralmente excita um movimento específico e não um único músculo (GUYTON; HALL, 2011).

Em um estudo comparou os efeitos entre testosterona, nandrolona, stanozolol e gestrinona sobre a morte neuronal excitotóxica induzida por NMDA em culturas primárias de células do córtex de ratos. Os dados encontrados sugerem que altas doses de EAA elevam a vulnerabilidade neuronal com aumento de citotoxicidade celular e isso pode, portanto, facilitar a morte neuronal. Nosso trabalho confirma os resultados desse estudo, pois acreditamos que os esteroides exibam atividade citotóxica resultando na morte dos neurônios (ORLANDO, et al., 2007).

Um estudo realizado em ratos tratados com o esteroide anabolizante stanozolol durante 4 semanas, demonstrou que o esteroide reduz a quantidade de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal, além de reduzir a serotonina no hipocampo (TUCCI, et al., 2012). Acredita-se que a diminuição na transmissão de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal, está relacionada ao aparecimento de depressão (BERTON; NESTLER, 2006; MIZOGUCHI, 2004). A redução desses neurotransmissores pode estar associada a um defeito no mecanismo celular de síntese das mesmas. Os resultados do nosso trabalho, onde os animais foram tratados por 8 semanas, nos faz sugerir que o dano causado aos neurônios pode ir além de interferências na produção de neurotransmissores, mas também pode causar a morte dos neurônios quando estes são expostos ao esteroide por um maior período de tempo.

7.3 CÓRTEX CEREBRAL – ÁREA SENSITIVA

As sensações somáticas correspondem aos mecanismos neurais responsáveis pela aquisição de informações sensoriais. Essas sensações podem ser mecanorreceptivas, caracterizadas pela detecção de tato e posição do corpo; termorreceptivas, que se referem à detecção de frio e calor; e sensações de dor, na qual ocorre detecção de dor mediante lesão dos tecidos (GUYTON; HALL, 2011).

A área somestésica ou área da sensibilidade somática está localizada no giro pós-central, onde chegam radiações talâmicas trazendo impulsos nervosos relacionados à temperatura, dor, pressão, tato, etc (MACHADO, 2006).

Camundongos tratados por 28 dias com injeções de 15 mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram uma diminuição significativa na quantidade dos transcritos (genes de receptores de serotonina) *htr1a*, *htr1b*, *htr2a* e *htr7* no córtex pré-frontal, além disso, apresentaram redução de 36,6% na quantidade do transcrito *htr1b* no hipocampo (AMBAR, 2008). Podemos sugerir que a diminuição de transcritos dos receptores de serotonina também pode estar associada à diminuição de corpos de neurônios de animais tratados com o decanoato de nandrolona, como mostrado em nosso trabalho.

Um estudo utilizando ratos tratados com o decanoato de nandrolona por 6 semanas, demonstrou aumento significativo de testosterona e DHT séricas. Além disso, avaliaram alguns órgãos que demonstraram alterações prejudiciais: o coração demonstrou fibrose parcial no miocárdio, pericárdio e degeneração vacuolar das fibras cardíacas; os rins sofreram danos em suas células tubulares que apresentaram inchadas e em número reduzido, além de hemorragia nos túbulos distais; a próstata apresentou-se macroscopicamente hipertrofiada e o número de células de Sertoli reduzido (TAKAHASHI; TATSUGI; KOHNO, 2004). Além disso, os EAA têm demonstrado inúmeros efeitos deletérios como hepatotoxicidade, cardiomiopatia, disfunção gonadal, ginecomastia, efeitos físicos e psicológicos como a depressão (AGIS-BALBOA, et al., 2009; CHRISTEN, et al., 2012; RITTER, 2012, TUCCI, et al., 2012).

Desse modo, acreditamos que as perdas causadas pelos EAA não estão restritas somente a outros órgãos estudados, mas também ao sistema nervoso central. Então, os EAA podem provocar não somente a perda ou diminuição de função das células nervosas, como a redução de receptores de serotonina, mas também a morte dos neurônios pelo fato de os EAA atuarem diretamente no núcleo da célula (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Mediante os resultados obtidos nas áreas do córtex cerebral, podemos sugerir que a administração crônica de doses específicas dos EAA, utilizados nos experimentos deste estudo, contribuiu para a ocorrência de diminuição de corpos celulares de neurônios nas áreas límbica, motora e sensitiva do córtex cerebral dos animais. Nosso estudo corrobora os resultados de outro estudo, no qual demonstraram que o uso de esteroides anabolizantes está associado à redução de neurônios em regiões do córtex cerebral de camundongos (DAMIÃO et al, 2012).

7.4 HIPOCAMPO

O hipocampo está situado no lóbulo temporal médio, em localização profunda em relação à superfície cortical. Ele se desenvolve até o período da adolescência e é uma região de considerável plasticidade neuronal (ATAEI; EBRAHIMZADEH-BIDESKAN, 2014).

O hipocampo é dividido anatomicamente em duas grandes regiões: O giro denteado, constituído por células granulares e o corno de Ammon, rico em células piramidais excitatórias. O corno de Ammon é dividido em três subregiões: Ca1, Ca2 e Ca3 (LEIN, 2004). Essas regiões são separadas umas das outras, com base no tamanho das células piramidais residentes e nas ligações entre elas. Em contraste com os neurônios motores da medula espinal, as células piramidais hipocampais possuem duas árvores de dendritos, e estes surgem a partir de lados opostos do corpo celular: os dendritos basais emergem a partir do lado que dá origem ao axônio e os dendritos apicais, surgem no lado oposto. Em muitas regiões cerebrais as espinhas dendríticas têm duas entradas, uma excitatória e outra inibitória. Na área Ca1, no entanto, cada coluna de células piramidais tem apenas uma sinapse, que é excitatória (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

O hipocampo está associado a importantes funções relacionadas ao comportamento e à memória (ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2008; LEIN; ZHAO; GAGE, 2004). Indivíduos que sofreram remoção bilateral dos hipocampos conseguem acessar a memória aprendida, mas perdem a capacidade de aprendizagem para informações novas. O hipocampo também está integrado à tomada de decisões, pois quando essa região interpreta um sinal neuronal como importante provavelmente essa informação será armazenada na memória (ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2008).

As sinapses em neurônios piramidais Ca1 têm sido amplamente estudadas como um modelo celular de aprendizagem e memória. É uma região de marcante heterogeneidade nos mecanismos moleculares em resposta a estímulos. Os dendritos basais e apicais diferem-se em termos de inervação e mecanismos moleculares de indução e manutenção da potenciação a longo prazo (LTP) (RAMACHANDRAN et al., 2014).

A testosterona desempenha um papel fundamental na diferenciação e crescimento celular. Em neurônios, a testosterona atua induzindo alterações a nível celular que podem levar a alterações de comportamento, humor e da memória. A testosterona pode ser tanto neuroprotetora como neurodegenerativa. O tratamento de células de neuroblastoma, com altas concentrações de testosterona por um curto período de tempo demonstrou uma redução da

viabilidade celular por ativação da morte celular programada ou apoptose. Esta pode ser iniciada pelo excesso de Ca^{2+} intracelular, causado pelo excesso de testosterona (ESTRADA; VARSHNEY; EHRLICH, 2006). Assim como o excesso de testosterona por curto período de tempo causou apoptose em células de neuroblastoma, acreditamos que altas doses de EAA por longos períodos de tempo, podem causar a morte celular programada em neurônios saudáveis como aqueles presentes na área Ca1, porque em usuários de EAA os análogos da testosterona encontram-se em excesso no interior das células.

O hipocampo apresenta grande importância no aprendizado e memória. Além disso, também contribui na regulação dos estados emocionais e agressividade. Um estudo utilizando o decanoato de nandrolona demonstra uma participação deste esteroide anabolizante na modulação serotoninérgica, resultando em uma diminuição na densidade de receptores 5HT1B no hipocampo (KINDLUNDH et al, 2003). Assim como os EAA podem causar uma redução de receptores, acredita-se que altas doses administradas cronicamente podem levar também a morte celular em Ca1 e não somente perda de seus receptores por interferência no mecanismo de síntese dos mesmos.

A área Ca2 do hipocampo funciona como um meio de ligação entre as áreas Ca1 e Ca3 e é tanto funcionalmente, quanto estruturalmente diferente das duas. Os neurônios da área Ca2 possuem uma extensa variedade de receptores e neurotransmissores, como fator de crescimento de fibroblasto-2, neurotrofina-3 e receptores de vasopressina-1b. Além disso, é a única região do hipocampo que recebe fibras do hipotálamo posterior. A região Ca2 tem como importante função, a regulação neuronal do comportamento social e de memórias associadas a estímulos olfatórios (STEVENSON; CALDWELL, 2014).

O decanoato de nandrolona pode causar diminuição da expressão do RNAm das subunidades NR2A e NR2B do receptor N-metil-d-aspartato (NMDA) no hipocampo, além disso, pode alterar o perfil neuroquímico do receptor, gerando implicações comportamentais importantes (LE GREVES et al., 1997). Assim como o decanoato de nandrolona causa redução da expressão do RNAm para estes receptores, acredita-se que também possa causar redução de células Ca2 por interferência na expressão do RNAm para síntese de proteínas e componentes vitais para a sobrevivência da célula neuronal, o que explicaria o motivo pelo qual houve redução de neurônios nos animais dos grupos III e IV.

Assim como os resultados da área límbica, os resultados em Ca2 nos mostram que o grupo tratado com Durateston® (II) não demonstra redução de neurônios quando comparado ao grupo controle. Isso nos faz sugerir que o responsável pela redução de neurônios nos animais do grupo IV seja, principalmente, o Decanoato de Nandrolona®. Pois ele, mesmo ao

ser administrado sozinho (no grupo III), causou essa alteração na quantidade de neurônios tanto na área límbica, como na área Ca2. Acredita-se que isso ocorreu porque a nandrolona presente no decanoato de nandrolona possui atividade anabólica mais elevada quando comparada com a testosterona do Durateston® (AMBAR, 2008; DEF, 2014).

A área Ca3 não demonstrou diminuição de neurônios como observado nas demais áreas do hipocampo. Um estudo demonstrou o mecanismo de neurogênese hipocampal adulta induzido pelo exercício físico, onde ratos machos foram submetidos a exercícios físicos leves durante 11 semanas, podemos sugerir que os esteroides anabolizantes causaram danos, mas por outro lado o exercício físico pode ter estimulado a neurogênese, não permitindo visualização de menor número de células na área Ca3 (OKAMOTO et al., 2012).

Alguns estudos mostram que o NMDA no hipocampo de ratos machos, regula as vias de sinalização responsáveis pela plasticidade sináptica, que é muito importante para as funções hipocampais (ROSSBACH, 2007). O uso de EAA causa diminuição do receptor NMDA, reduzindo a plasticidade sináptica, porém, não necessariamente reduz o número de corpos de neurônios na área Ca3 como foi observado nos resultados acima.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os experimentos realizados neste estudo e com a metodologia utilizada, é possível afirmar que o uso dos esteroides anabolizantes Durateston® (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona) e Deca-Durabolin® (decanoato de nandrolona), provocaram diminuição na quantidade de corpos celulares de neurônios na área límbica, sensitiva e motora do córtex cerebral e nas áreas Ca1 e Ca2 no hipocampo de camundongos. Entretanto, não demonstrou significância quanto à quantidade de corpos celulares de neurônios na área Ca3 no hipocampo dos animais tratados, sugerindo que nenhum dos esteroides causou danos nesta área.

De modo geral, ambos os esteroides anabolizantes demonstraram efetividade ao causarem diminuição na quantidade de células neuronais. No entanto, o Deca-durabolin® provocou uma redução ainda mais pronunciada quando comparado ao Durateston®, que não causou essa redução na área límbica do córtex cerebral e na área Ca2 do hipocampo. Então, acreditamos que o uso de Deca-durabolin® é mais prejudicial a essas áreas.

Em relação ao grupo tratado com ambos os anabolizantes simultaneamente, observou-se uma redução significativa de corpos de neurônios em todas as áreas analisadas, exceto na área Ca3. Baseado nisso, podemos afirmar que o uso concomitante de dois esteroides, muito comum nas academias de musculação, pode causar danos ainda mais intensos quando comparado ao uso individual dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

- AGIS-BALBOA, R. C. et al. Enhanced fear responses in mice treated with anabolic androgenic steroids. **Neuroreport**. Chicago, Illinois, USA, n. 20, v. 6, p. 617–621, abr 2009.
- AMBAR, G. **Efeitos da administração prolongada do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona em comportamentos emocionais e na expressão de genes relacionados ao sistema serotoninérgico em diferentes áreas cerebrais de camundongos**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo,SP, 2008.
- ATAEI, M. L.; EBRAHIMZADEH-BIDESKAN, A. R. The effects of nano-silver and garlic administration during pregnancy on neuron apoptosis in rat offspring hippocampus. **Iran J Basic Med Sci**, v. 17, n. 6, Iran, Jun 2014.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery beyond monoamines. **Nat Rev Neuroscience**. v. 7, p. 137-151, 2006.
- BROWER, K.J. Anabolic steroids. **Psychiatr Clin North Am**. v.16, n.1, p. 97–103, 1993.
- CECCHETTO, F.; MORAES, D.R.; FARIAS, P.S. **Distintos enfoques sobre esteroides anabolizantes: riscos à saúde e hipermasculinidade**. Interface - Comunicação., Saúde, Educação, Rio de Janeiro, Brasil,v.16, n.41, p.369-82, abr./jun. 2012.
- CHRISTEN, L. et al. Nonprescription Steroids on the Internet. **Subst Use Misuse**, v. 47, n. 3, p. 329–341, fev. 2012.
- 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.
- CRUZ, F. C. et. al. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. **J. Psychopharmacol**, Araraquara,Brasil, n. 26, v. 10, p. 1366-74, 2012.
- CUNHA, T. S et al. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Campinas, Brasil, v. 50, n. 3, p. 532-540, jun. 2006.

CUNNINGHAM, R. L., CLAIBORNE, B. J., MCGINNIS, M. Y. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. **Neuroscience**, San Antonio-Texas, v. 150, n. 3, p. 609-615, dec. 2007.

DAMIÃO, B. et al. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteróides Anabolizantes. **Revista de Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 68-72, Brasil, 2012.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS DEF. 42 ed. Editora EPUC, 2014.

ESPERIDIÃO-ANTÔNIO, V. et al. Neurobiologia das emoções. **Revista de psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 2, p. 55-65, 2008.

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

FRAGKAKI, A. G. et al. Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to the anabolic and androgenic activities applied modifications in the steroidal structure. **Rev Steroids**, v. 74, p. 172–197, 2009.

FRANKLIN, K. B. J, PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Elsevier**: Oxford, UK, 2007.

GHAPHERY, N.A. Performance-enhancing drugs. **Orthop Clin N Am**; 26433-42. 1995.

GOODMAN GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed., Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (editores). New YorkMcGraw-Hill; 2012.

GUYTON ; HALL. **Tratado de fisiologia médica**, 12. ed. Elsevier; 2011.

IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEAN, R. G. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 773-782, abr, 2009.

KANAYAMA, G., et al. Illicit Anabolic Androgenic Steroid Use. **Horm Behav**, v. 58, n. 1, p. 111–121, jun. 2010.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. McGraw-Hill Companies. 4th_edition, USA, 2000.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, London, UK, n.154, p. 502–521, 2008.

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.

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

LEIN, Ed. S.; ZHAO, X.; GAGE, F. H. Defining a Molecular Atlas of the Hippocampus Using DNA Microarrays and High-Throughput *In Situ* Hybridization. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 15, p. 3879 –3889, Mexico, 2004.

LUKAS, S. E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. **TIPS**1461-8. 1993.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**, 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Manual de quantificação Morfológica**: morfometria, alometria e estereologia. 2.ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994.

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

MARQUES, M. A. S. et al. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Rev Bras Med Esporte**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 15-24, fev. 2003.

MIZOGUCHI, K. Prefrontal córtex. In: Otani Satorufrom (Ed), synaptic plasticity to codnition, Kluwer Academic Publishers ed; 2004.

OKAMOTO, M., et al. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. **PNAS**, Japan, v. 109, n. 32, aug 2012.

ORLANDO, R. et al. Nanomolar concentrations of anabolicandrogenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. **Brain Research**, n. 11, v. 65, p. 21-29. 2007.

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

PENATTI, C. A. A. et al. Chronic Exposure to Anabolic Androgenic Steroids Alters Activity and Synaptic Function in Neuroendocrine Control Regions of the Female Mouse. **Neuropharmacology**, Hanover, NH, n. 61, v. 4, p. 653–664. Set, 2011.

RAMACHANDRAN, B. et. al. Ethanol inhibits long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Neurons, Irrespective of Lamina and Stimulus Strength, Through Neurosteroidogenesis. **Hippocampus**, Aug, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22356/pdf>>. Acesso em: 02/09/2014.

RIBAS, G. C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n. 1, v. 29 São Paulo, Brasil, 2007.

RITTER, J. M. Sex, steroids and anabolic androgens in athletics. **British journal of clinical pharmacology**, London, UK, v. 74, p. 1, 2012.

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.

SALAS-RAMIREZ, K. Y.; MONTALTO, P. R.; SISK, C. L. Anabolic Steroids have long-lasting effects on male social behaviors. **Horm Behav**, v. 208, n. 2, p. 328-335, Abr. 2010.

SHAHIDI, N. T. A Review of the Chemistry, Biological Action, And Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. **Clinical Therapeutics**, USA, v. 23, n. 9, 2001.

STEVENSON, E. L.; CALDWELL, H. K. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. **European Journal of Neuroscience**, pp. 1–8, USA, 2014.

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and Pathological Effects of Anabolic-androgenic Steroid in Male Rats. **Endocrine Journal**, v. 51, n. 4, p. 425-434, Japan, 2004.

TASGIN, E.; LOK, S.; DEMIR, N. Combined use of testosterone and nandrolone may cause heart damage. **African Journal of Biotechnology**, Konya, Turkey, v. 10, n. 19, p. 3766-3768, May, 2011.

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

URHAUSEN, A.; TORSTEN, A.; WILFRIED, K. Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic–androgenic steroid abusers. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 84, p. 369–375, 2003.

VENÂNCIO, P. D. et al. Esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. São Paulo, Brasil, **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 3, p. 191-195, jun, 2010.

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

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