

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - MG

BRUNO DAMIÃO

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE
CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS EM REGIÕES
CORTICAIS E HIPOCAMPAIS E AVALIAÇÃO
COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS SOB O
USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.**

Alfenas/MG
2014

BRUNO DAMIÃO

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE
CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS EM REGIÕES
CORTICAIS E HIPOCAMPAIS E AVALIAÇÃO
COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS SOB O
USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à
Saúde pela Universidade Federal de Alfnas. Área de
Concentração: Neurociências e Comportamento
Orientadora: Alessandra Esteves.

Alfnas
2014

Damião, Bruno.

Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nas regiões corticais e hipocâmpais e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteróides anabolizantes. / Bruno Damião. - 2014.

88 f. -

Orientadora: Alessandra Esteves.

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

Bibliografia.

1. Neurônios. 2. Esteroides anabólicos. 3. Córtex cerebral. 4. Hipocampo (Cérebro). 5. Ansiedade. 6. Memória. I. Esteves, Alessandra. II. Título.

CDD: 573.86

BRUNO DAMIÃO

**ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE
CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS EM REGIÕES
CORTICAIS E HIPOCAMPAIS 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 Biociências
Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas. Área de concentração: Neurociências e
Comportamento.

Aprovada em: 26/08/14

Prof. *Alessandra Porteira*
Instituição: *Unifal-MG*

Assinatura: *Alessandra*

Prof. *Ambrósio D. S. Costa*
Instituição: *Unifal - MG*

Assinatura: *Ambrósio*

Prof. *Maria Rita Rodrigues*
Instituição: *UNIFAL-MG*

Assinatura: *Maria Rita*

Dedico aos meus pais, Carlos Alberto e Terezinha, por todo o apoio, esforço, confiança e carinho a mim dedicados; aos meus irmãos Breno e Felipe e ao meu filho Henri, por todo afeto e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para continuar perseguindo meus objetivos, independente dos caminhos escolhidos.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Terezinha, por me apoiarem em todas as minhas decisões, pelo carinho, pelo caminho que começaram a traçar para mim na minha infância, são os responsáveis diretos por todas as conquistas obtidas.

Ao meu irmão, Breno, pela amizade e pelo eterno apoio e companheirismo.

Ao meu filho, Henri, que com toda sua alegria e educação alegre a todos, trazendo mais vida e felicidade para todos.

Aos meus bons amigos, Anderson Nunes, Augusto Duarte Alvarenga, Bruno César, ÉricGelati, Guilherme Gonzales, TalysonBolelli e RaoniMarzolo, dentre outros, que de maneira direta ou indireta contribuíram para o meu desenvolvimento científico e pessoal, além de estarem ao meu lado nos momentos mais divertidos e também nos mais difíceis.

Aos meus amigos de minha terra natal, companheiros desde a infância, Arthur, Débson, Giovani, Luís Fernando, Matheus, Renan, Rogério, Vitor. Presentes desde os anos iniciais de escola até os dias atuais, obrigado por tudo.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), por toda a educação e dedicação ao laboratório, por toda a ajuda, pelos cafés, por todos os bons papos, por tudo que por mais que pareça pequeno tem influência direta no desenvolvimento do laboratório e das pesquisas nele realizadas. Incluo neste parágrafo de agradecimentos os técnicos, professores e companheiros de pesquisa, antigos e os novos que foram surgindo ao longo do mestrado, pois todos tem contribuição direta no meu trabalho.

Um agradecimento especial para minha orientadora, Alessandra, que pacientemente, desde 2010, vem me ajudando a desenvolver ciência, me ensinando a caminhar e a seguir em minha carreira acadêmica. Obrigado por toda a dedicação e apoio, sempre com carinho e boa vontade. Aproveito este parágrafo para agradecer também seu marido, Wagner, pela contribuição direta e ajuda em todas as pesquisas e trabalhos desenvolvidos por mim até hoje no Laboratório de Anatomia.

RESUMO

O uso de esteroides anabólicos androgênicos (EAA), conhecidos popularmente como anabolizantes ou bomba, vem crescendo nos últimos anos, junto a este fato, temos uma crescente oferta de produtos falsificados. Esses fatores, quando combinados a uma educação de baixa qualidade, torna o Brasil um dos países entre os maiores consumidores de substâncias anabolizantes no mundo. Devido ao risco quando utilizados sem o devido acompanhamento médico, tais substâncias estão sendo continuamente estudadas, visando elucidar com dados empíricos seus reais efeitos deletérios e seus possíveis benefícios quando adequadamente utilizados, como no meio médico. O presente estudo analisou os efeitos de dois EAAs, vendidos no Brasil como Winstrol Depot® (Stanozolol) e Deposteron® (Cipionato de Testosterona) sobre a perda neuronal, através da estimativa da densidade de corpos celulares de neurônios em três regiões corticais (Límbica, Motora e Sensitiva) e três regiões hipocâmpais (CA1, CA2 e CA3), além da análise comportamental buscando alterações em parâmetros relacionados à ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado - LCE), memória (Análise da Memória e Reconhecimento de Objetos) e atividade locomotora (Campo Aberto). Para isso, foram utilizados 60 camundongos da linhagem Swiss, sendo 30 machos e 30 fêmeas, vindos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os camundongos foram separados em três grupos: Controle e grupos experimentais Deposteron® e Winstrol Depot®, ambos com 20 animais cada, sendo 10 machos e 10 fêmeas por grupo. Os animais receberam os anabolizantes ou solução fisiológica duas vezes na semana (terças e quintas-feiras) e submetidos a 15 minutos de natação três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras), durante um mês. O peso dos animais foi aferido todas as segundas-feiras do período de tratamento. Após o término do tratamento os animais realizaram os testes comportamentais e foram sacrificados pela inalação do anestésico Alotano®, tiveram seus encéfalos retirados e estes foram armazenados em solução de formaldeído a 4% por três semanas. De cada encéfalo foram retiradas amostras homotípicas da região média do cérebro em cortes transversais para que pudéssemos avaliar as áreas estabelecidas para este estudo. Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução na densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios de todas as áreas corticais e hipocâmpais analisadas no grupo de fêmeas tratadas com Deposteron® e em algumas regiões (CA2 e CA3) no grupo de fêmeas tratadas com Winstrol Depot®,

quando comparadas ao grupo Controle. Os resultados mostram também que houve redução na densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nos animais machos na área límbica e na região CA1 do hipocampo de ambos os grupos experimentais (Deposteron® e Winstrol Depot®). Os testes comportamentais revelaram que houve um aumento nos parâmetros relacionados à ansiedade e ao comportamento apático enquanto não houveram alterações relacionadas à atividade motora e à memória dos animais dos grupos experimentais.

Palavras-Chave: Neurônios; Esteroides Anabólicos; Córtex Cerebral; Hipocampo; Ansiedade; Memória.

ABSTRACT

The use of AAS (Anabolic-Androgenic Steroids), currently known as steroids or “roids”, has increased in the last years due to a growing bid of faked products. This fact, allied to a low-quality scholarship, put Brazil among the most anabolic-drug consuming countries in the world. Because of their use-risk without medical follow-up these drugs has being studied extensively in order to clarify by empiric data their actual harmful effects or potential benefits when properly used. The present study analyzed the effects of two AAS, sold in Brazil as Winstrol Depot® (stanozolol) and Deposteron® (testosterone cypionate), upon neuronal loss by means of estimated profile analysis of neuron cell bodies density in three cortical areas (limbic, motor and sensorial) and three hippocampal areas (CA1, CA2 and CA3), besides a behavioral analysis searching for changes in parameters related to anxiety (Elevated Plus Maze – EPM), memory (Memory Analysis and Object Recognition Memory) and motor activity (Open Field). For the experiment, we used 60 *Swiss* mice, 30 males and 30 females, which were divided into three groups: control, Deposteron®-treated, and Winstrol Depot®-treated, each one composed by 20 animals, 10 males and 10 females. The animals received AAS or saline solution twice a week (on Tuesdays and Thursdays) and were put on 15-minute swimming exercises thrice a week (on Mondays, Wednesdays and Fridays) for 30 days. After experiment-ending, the specimens accomplished behavioral tests and were euthanized by halothane inhalation. Their brains were withdrawn and stored in 4% paraformaldehyde solution for 12 hours. Homotypic cross-sections samples from each brain’s middle area were taken in order to evaluate the areas concerning our study. The results showed that there was a reduction in the estimated profile analysis of neuron cell bodies density of all cortical and hippocampal areas in female mice treated with Deposteron® and in hippocampal areas (CA2 and CA3) of female mice treated with Winstrol Depot® when compared to control group. A reduction in the estimated profile analysis of neuron cell bodies density was also displayed in limbic and hippocampal CA1 areas of male mice in both ASS-treated groups. Behavioral tests revealed that there was an increase in parameters related to anxiety and apathetic behavior while there were no detectable changes concerning motor activity or memory in AAS-treated animals on both groups.

Key words: Neurons; Anabolic; Cortex; Hippocampus; Anxiety; Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Caixa de Plástico utilizada para a natação.....	36
Figura 2 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE), aparato utilizado para os testes comportamentais referentes à ansiedade.....	37
Figura 3 - Aparato (caixa) utilizado para o teste comportamental Memória e Reconhecimento de Objetos.....	38
Figura 4 - Aparato experimental de acrílico, na forma de uma arena circular, utilizado no teste do Campo Aberto.....	39
Figura 5 - Fotografia do corte frontal de um cérebro de camundongos.....	40
Figura 6 - Fotografia de uma imagem representativa de área teste para estimativa dos perfis de corpos celulares de neurônios.....	41
Gráfico 1 - Media dos pesos em gramas de cada grupo experimental	43
Gráfico 2 - Taxa de entrada nos braços fechados do LCE.....	45
Gráfico 3 - Taxa de entrada nos braços abertos do LCE.....	45
Gráfico 4 - Tempo de permanência, em porcentagem, nos braços fechados do LCE.....	46
Gráfico 5 - Tempo de permanência, em porcentagem, nos braços abertos do LCE.....	47
Gráfico 6 - Exploração global, em segundos.....	48
Gráfico 7 - Exploração global teste, em segundos.....	48
Gráfico 8 - Taxa de discriminação	49
Gráfico 9 - Número médio de vezes que os animais cruzaram, com as quatro patas, as linhas internos do aparato.....	50
Gráfico 10 - Número médio de vezes que os animais cruzaram com as quatro patas, as linhas externas do aparato.....	50
Gráfico 11 - Cruzamentos totais	51
Gráfico 12 – Rearings, conhecidos também por verticalização do tronco.....	51
Gráfico 13 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área límbica (cortical), fêmeas.....	52
Gráfico 14 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área límbica (cortical), machos.....	53
Gráfico 15 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área motora (cortical), fêmeas.....	54
Gráfico 16 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área motora (cortical), machos.....	55
Gráfico 17 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área sensitiva (cortical), fêmeas.....	56
Gráfico 18 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área sensitiva (cortical), machos.....	57
Gráfico 19 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares	

de neurônios da região hipocampal CA1, fêmeas.....	58
Gráfico 20 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da região hipocampal CA1, machos.....	59
Gráfico 21 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da região hipocampal CA2, fêmeas.....	60
Gráfico 22 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da região hipocampal CA2, machos.....	61
Gráfico 23 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da região hipocampal CA3, fêmeas.....	62
Gráfico 24 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA3, machos.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	A BUSCA PELA TESTOSTERONA.....	17
2.2	ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAAS).....	19
2.3	HISTÓRIA DOS EAAS NO ESPORTE.....	21
2.4	USO TERAPÊUTICO DE ANABOLIZANTES.....	22
2.5	EFEITOS COLATERAIS DEVIDO AO ABUSO DE EAAS.....	23
2.6	PREVALÊNCIA DO USO DE EAAS NO BRASIL E NO MUNDO.....	27
2.7	CÓRTEX CEREBRAL	28
2.8	HIPOCAMPO.....	29
2.9	MEMÓRIA.....	29
2.10	ANSIEDADE	30
3	JUSTIFICATIVAS	32
4	OBJETIVOS	33
5	MATERIAS E MÉTODOS	34
5.1	ANIMAIS.....	34
5.2	TRATAMENTO	34
5.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	36
5.3.1	Análise da Ansiedade – Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	36
5.3.2	Análise de Memória e Reconhecimento de Objetos	37
5.3.3	Atividade Motora Espontânea no Campo Aberto	38
5.4	COLETA DE AMOSTRAS.....	39
5.5	PROCESSAMENTO E COLORAÇÃO	40
5.6	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS.....	40
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
6	RESULTADOS	43
6.1	PESO CORPÓREO.....	43
6.2	ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	43
6.2.1	Análise da Ansiedade – Labirinto em Cruz Elevado	44

6.2.2	Análise de memória de reconhecimento de objetos	47
6.6.3	Campo Aberto: Atividade Motora Espontânea	49
6.3	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS	51
6.3.1	Áreas Corticais	52
6.3.1.1	Área Límbica.....	52
6.3.1.2	Área Motora.....	53
6.3.1.3	Área Sensitiva.....	55
6.3.2	Áreas Hipocampais	57
6.3.2.1	CA1.....	57
6.3.2.2	CA2.....	59
6.3.2.3	CA3.....	61
7	DISCUSSÃO	63
7.1	PESO CORPÓREO.....	63
7.2	ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	64
7.2.1	Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	64
7.2.2	Análise de Memória e Reconhecimento de Objetos	65
7.2.3	Campo Aberto: Atividade Motora Espontânea	66
7.3	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DENEURÔNIOS	68
8	CONCLUSÕES	71
9	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios esteroides são produzidos pelo córtex da suprarrenal e pelas gônadas (ovário e testículo) (HANDELSMAN, 2001). O hormônio esteroide produzido em maior quantidade é o cortisol, secretado pela parte média do córtex da glândula adrenal humana, a zona fasciculada. (KAPIT; MACEY; MEISAMI, 2004). A testosterona é no organismo masculino o esteroide sexual mais abundante, sendo secretada em torno de 95% pelos testículos e cerca de 5% pelas glândulas suprarrenais (MARQUES; PEREIRA; AQUINO NETO, 2003; LIMA; CARDOSO, 2011). Nas mulheres ele também é produzido, mas em baixas quantidades e apenas pelas glândulas suprarrenais (LIMA; CARDOSO, 2011). Os efeitos da testosterona e dos andrógenos são divididos em duas categorias principais: efeitos androgênicos, relacionado às funções reprodutoras e características sexuais secundárias, e os efeitos anabólicos, relacionados à estimulação do crescimento dos tecidos não reprodutores.

Os esteroides anabolizantes ou esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) referem-se aos hormônios esteroides da classe dos hormônios sexuais masculinos, um grupo de compostos naturais e sintéticos formados a partir da testosterona ou de um de seus derivados (LISE et al., 1999; PARKINSON; EVANS, 2006; FARRELL; MCGINNIS, 2003). São promotores e mantenedores das características sexuais associadas à masculinidade (incluindo o trato genital, as características sexuais secundárias e a fertilidade) e do status anabólico dos tecidos somáticos (HANDELSMAN, 2001; EVANS, 2004).

Mesmo sendo proibido a partir de 1989, o uso de EAA é comum no meio desportivo, competitivo ou não (NORTON; OLDS, 2001; SILVA et al., 2007). Nas últimas décadas, o treinamento de força ganhou destaque como parte indispensável de uma vida saudável, esse aumento de interesse neste tipo de treinamento ocorreu após o American College of Sports Medicine (ACSM) ter ditado os benefícios desses treinamentos. Através desse fato, vemos o consumo de esteroides subir absurdamente (SIMÕES, 2003). As doses de EAA utilizadas por fisiculturistas e demais atletas, profissionais ou não, chegam a ser de 10 a 40 vezes maior do que aquelas indicadas para o medicamento (VAN BREDA et al., 2003). O uso ilícito dos EAA ocorre por atletas com a intenção de aumentar a massa muscular, a força física e a agressividade em competições, e diminuir o tempo de recuperação entre exercícios intensos (THEIN et

al., 1995; GOLDBERG et al., 1996; ALARANTA et al., 2006). Também é descrito o uso pela expectativa de tratar ou prevenir lesões decorrentes da prática de esportes.

Os EAA têm sido abusados, também, por não atletas com fins estéticos, pelo desejo de ganhar massa magra e melhorar a aparência, (MATSUMOTO, 1996). Assim, o consumo abusivo de EAA dentro e fora do meio desportivo, constitui uma grande preocupação social, governamental e das mais importantes agências e órgãos sanitários e esportivos, como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Comitê Olímpico Internacional (COI) (SILVA et al., 2007; MARTIN; DAYYEH; CHUNG, 2008).

Segundo o Ofício número 201, da Confederação Brasileira de Culturismo e Musculação (COFEN, 1998), encontramos no Brasil o uso indevido de drogas medicamentosas com finalidades anabolizantes, que apesar de precisarem de prescrição médica/médica veterinária, são encontrados facilmente, comprados principalmente através do mercado ilegal. Além destes fármacos, pode-se observar que existe ainda a utilização abusiva de substâncias destinadas a uso veterinário, principalmente para equinos de competição. Produtos importados ilegalmente, muitos derivados de perigosas falsificações, são comercializados livremente no país, o que, além de colocar em risco a saúde dos usuários destes produtos de baixa qualidade, dificulta, e até mesmo inviabiliza, o controle correto pelos órgãos oficiais (AMES; SOUZA, 2012).

Muitos estudos, no Brasil e no mundo, vêm tentando traçar um perfil do uso de EAA. Nos Estados Unidos, um estudo realizado mostrou que 6,6% dos estudantes do sexo masculino avaliados tinham feito uso de esteroides pelo menos uma vez durante suas vidas, desses, 65% admitiram ter participado de escolas patrocinadoras de atletismo, futebol ou beisebol (WALKER; ADAMS, 2009). Cerca de 6% dos alunos do ensino médio estadunidense, jogadores de futebol, assumiram ter utilizado EAA. Quando observado o uso dentre os universitários do mesmo país, o índice de uso entre os atletas subiu para cerca de 20% (STILGER; YESALIS, 1999).

Dados do CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) coletados nas últimas décadas mostram o assustador aumento no consumo das drogas consideradas como “drogas da imagem corporal” entre os frequentadores de academias de ginástica. Alguns estudos quantitativos realizados descrevem um grande consumo dessas substâncias entre praticantes de musculação, incluindo o uso de produtos veterinários, em academias de São Paulo, Rio de Janeiro,

Porto Alegre e Goiás (IRIART; ANDRADE, 2002; SABINO, 2002; SILVA et al., 2007).

Estudos relatam que o uso abusivo de EAAs possui efeitos adversos sobre a saúde mental, que variam desde alterações em parâmetros comportamentais, como ansiedade e agressividade (CORRIGAN, 1996; MARTINEZ-SANCHES et al., 1998), até estudos que demonstraram o efeito deletério dos anabolizantes sobre o número de corpos de neurônios em cérebros de camundongos (DAMIÃO et al., 2012). A prevalência dos efeitos colaterais se mostra diretamente relacionada ao tipo de esteroide utilizado, a idade e o sexo do usuário e ao uso prolongado da droga (PARSSINEN, 2000; SADER, 2001).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A BUSCA PELA TESTOSTERONA

A história da testosterona começa a ser escrita cerca de 6000 anos atrás, quando fazendeiros descobriram que animais castrados eram mais facilmente domesticados (FREEMAN; BLOOM; McGUIRE, 2001). Egípcios e Romanos acreditavam que os testículos e o pênis de outros animais tinham poderes especiais. Atletas gregos usavam uma variedade de drogas para aumento de desempenho, que variavam desde extratos de plantas até extratos testiculares. Essas práticas deram início à busca por novas descobertas no ramo da endocrinologia (BHASIN et al., 1996).

Na Babilônia antiga acreditava-se que homens castrados perdiam a força física. A prática da castração humana deixou claro que a retirada dos testículos não afetava somente a fertilidade, mas também as características masculinas e a agressividade (SANTOS, 2007).

Em 1849, o médico alemão Arnold Berthold (1803-1861) fez um experimento com galos. Ao retirar os testículos desses animais, observou que as penas desses animais castrados ficavam menores, o interesse pelas fêmeas diminuía e os animais ficaram mais calmos. Ao reimplantar os testículos ou aplicar extratos do mesmo, Berthold observou que os animais voltavam a ter seus comportamentos agressivos típicos dos machos da espécie, além do interesse pelas fêmeas e demais características afetadas pela castração (FREEMAN; BLOOM; McGUIRE, 2001; NIESCHLAG, 2005; SANTOS, 2007).

Charles Edouard Brown-Sequard (1817-1894), famoso anatomista e fisiologista francês, é considerado um dos fundadores da endocrinologia moderna (FREEMAN; BLOOM; McGUIRE, 2001). Seu experimento mais conhecido foi aquele em que Brown-Sequard extraiu os testículos de cães e porcos da Guiné, transformando-os em extrato e aplicando em si mesmo. Aos 72 anos de idade, Brown-Sequard alegou que recuperou sua força, habilidades mentais, apetite e ainda parou de sofrer com constipação e também obteve melhoras no seu fluxo urinário (BHASIN et al., 1996; YESALIS, 1998).

A pesquisa mais sem ética e também a mais famosa da “organoterapia” ocorreu entre 1920 e 1930, na prisão de San Quentin, na Califórnia, onde Leo Stanley começou a transplantar testículos de prisioneiros executados para prisioneiros impotentes. Como seu suprimento era pequeno e a demanda devido aos resultados positivos alta, ele começou a utilizar testículos de outros animais. Após alguns anos, Stanley já tinha realizado centenas de cirurgias e “tratado” desde impotência até epilepsia (BHASIN et al., 1996; FREEMAN; BLOOM; McGUIRE, 2001).

Em 1930, o Dr. Charles Kochakian, demonstrou que o hormônio extraído da urina dos machos estimulava forte balanço nitrogenado positivo em cães castrados. Essa pesquisa estabelecia a propriedade anabólica e a construção de tecido pela testosterona, e muitos deles manifestam as atividades do hormônio masculino. (YESALIS, 1998; SANTOS, 2007). Desde então, Charles Kochakian é considerado o pai dos esteroides anabólicos (YESALIS, 1998).

Durante a década de 1930, as empresas farmacêuticas começaram a busca para isolar o hormônio testicular. O termo testosterona foi introduzido por David Karoly e sua equipe de pesquisa em 1935 (DAVID et al., 1935). No mesmo ano, Butendant e Hanisch, com um time de pesquisadores montado por uma empresa farmacêutica de Berlim, publicaram a técnica de como sintetizar a testosterona a partir do colesterol. “Uma semana depois, Leopold Ruzicka, que sintetizou a androsterona em 1934, publicou seu artigo intitulado “On the Artificial Preparation of the Testicular Hormone Testosterone” e pediu a patente. Em 1939, Butendant e Ruzicka ganharam o Prêmio Nobel de Química (FREEMAN; BLOOM; McGUIRE, 2001; DOTSON; BROWN, 2007).

Hoje, sabe-se que a testosterona é o hormônio esteroide androgênico mais importante produzido pelas células de Leydig nos testículos. Também é sintetizado pelo córtex da suprarrenal em ambos os sexos (SMITH et al., 1995; HANDELSMAN, 2001). A síntese dos hormônios androgênicos acontece a partir do colesterol, que após sucessivas oxidações, originam a pregnenolona, principal precursor dos hormônios esteroides (HANDELSMAN, 2001).

Os hormônios esteroides se unem com proteínas de ligação no plasma, entram nas células-alvo, onde são convertidos em outros hormônios esteroides. Dentro da célula, o hormônio entra no núcleo e se liga a receptores nucleares, ocorrendo à

transcrição do DNA. O RNA resultante se move então para o citoplasma para utilizar os ribossomos e o retículo endoplasmático, onde sintetizam proteínas que expressam a ação fisiológica do hormônio (KAPIT; MACEY; MEISAMI, 2004; IRIART; CHAVES; ORLEANS, 2009).

As ações da testosterona e dos androgênicos podem ser divididas em duas categorias: os efeitos androgênicos, relacionados à função e às características sexuais secundárias e os efeitos anabólicos, que estimulam o crescimento e a maturação dos tecidos não reprodutores. Ambas as funções possuem mecanismos intracelulares semelhantes, não havendo assim como separá-los (KANAYAMA et al., 2009; MILLER, 1995). A testosterona e seus metabólitos promovem o desenvolvimento do sistema genital, das características sexuais masculinas e têm efeitos anabólicos importantes sobre os ossos e musculatura esquelética. Os efeitos observados na puberdade são: crescimento peniano e testicular, crescimento ósseo e da massa muscular, aparecimento de pelos axilares, faciais e pubianos e o engrossamento das cordas vocais, além do aumento da libido e da agressividade (CURI; RUI, 2009).

No homem adulto normal, a concentração plasmática de testosterona varia de 300 a 1.000ng/dl e a taxa de produção diária está entre 2,5 e 11mg (HARDMAN, 1996). Dentre os esteroides androgênicos sintetizados pela suprarrenal, podemos destacar a DHEA (Desidroepiandrosterona) e a androstenediona. Todos esses androgênios são posteriormente convertidos em testosterona no fígado (SMITH et al., 1995; RANG et al., 1997).

2.2 ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAAs)

Aproximadamente 60 tipos de EAAs estão disponíveis, variando em suas estruturas químicas, o que implica em efeitos fisiológicos e psicológicos diferentes (QUINCEY; GRAY, 1967; BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001). Todos os anabolizantes possuem efeito androgênico, sendo que vários destes compostos possuem receptores no tecido cerebral (ROSELLI, 1998). Os EAA possuem estruturas semelhantes ao da testosterona endógena, compostos por quatro anéis com 19 átomos de carbono. Existem três principais classes de EAA (CLARK; HENDERSON, 2003):

A primeira classe é representada por compostos injetáveis, ésteres do grupo 17- β -hidroxil (propionato e cipionato de testosterona). A esterificação retarda a degradação do composto e prolonga o tempo de ação devido à liberação sistêmica mais lenta (SHAHIDI, 2001).

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

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

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

Os EAA possuem como características principais os seguintes pontos: capacidade de fixar proteínas; capacidade de reter água e nitrogênio, de aumentar o número de glóbulos vermelhos, de reduzir o estoque de gordura corporal, dentre algumas outras características. Ambas essenciais para o desenvolvimento e aumento do tecido muscular (SANTOS, 2007).

Estudos realizados no National Institute on Drug Abuse têm descrito que a forma com que os EAA são utilizados por atletas obedecem, basicamente, a três metodologias: a primeira, conhecida como “ciclo”, refere-se a qualquer período de utilização de tempos em tempos, que varia de quatro a 18 semanas; a segunda,

denominada “pirâmide”, começa com pequenas doses, aumentando-se progressivamente até o ápice e, após atingir esta dosagem máxima, existe a redução regressiva até o final do período; e a terceira, conhecida como “stacking” (uso alternado de esteroides de acordo com a toxicidade), refere-se à utilização de vários esteroides ao mesmo tempo. Há também entre os atletas o hábito comum de utilizar a mistura dos três métodos descritos acima. Os EAA são administrados, geralmente, em doses supra fisiológicas que poderão chegar a até 500mg por dia consumido por várias semanas ou meses (SILVA et al., 2002).

Um dos maiores desafios envolvendo os efeitos dos anabolizantes é a sua relação com a prática de exercícios físicos. Sabe-se que por si só, os exercícios de resistência aumentam a massa muscular. Um estudo realizado em 1996, por Bashin et al, em homens eugonadaís (que perderam ou tiveram seus testículos removidos por algum motivo), fez uma comparação entre os grupos que fizeram apenas exercício, um grupo placebo, um grupo tratado com anabolizantes e um grupo que fez exercícios e consumiu anabolizantes. Os resultados mostraram que o efeito dos anabolizantes é maior quando em conjunto a exercícios de resistência. Outros estudos mostraram que o exercício de resistência aumenta o número de receptores androgênicos em músculos de roedores e humanos (DESCHENES et al., 1994; BAMMAN et al., 2001). Se o número de receptores aumenta com o exercício, mais receptores vão estar disponíveis para ação dos anabolizantes (KUNHS, 2002).

2.3 HISTORIA DOS EAAs NO ESPORTE

A testosterona é sintetizada desde 1935, quando em 1939 foi sugerido seu uso para melhorar o desempenho de atletas (GHAPHERY, 1995; AQUINO NETO, 2001), porém, a primeira utilização dos EAA com essa finalidade em competição ocorreu em 1954, na Áustria, quando atletas russos que fizeram uso de testosterona obtiveram performances altamente satisfatórias em uma competição de levantamento de peso (ASSIS, 2002; CUNHA et al., 2004).

Após a bem sucedida experiência russa, os primeiros relatos sobre uso de testosterona e outros anabolizantes esteroides foi feito nos EUA, também entre levantadores de peso, o que logo se disseminou pelos esportes do país (TOOD, 1987).

Os métodos para detecção dos esteroides anabolizantes só se tornaram disponíveis por volta de 1970. Com esse novo método, a IOC (International Olympic Committee) adicionou em 1975 os anabolizantes na lista das substâncias proibidas e os testes se iniciaram nas Olimpíadas de Montreal, em 1976 (HATTON, 1987; MOTTRAM; GEORGE, 2000).

A falta de capacidade inicial dos testes em diferenciar os derivados sintéticos de testosterona e a testosterona endógena do atleta se mostrou problemática nas olimpíadas de 1984, onde todos os testes realizados para doping através da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa indicaram que as amostras analisadas eram positivas para o uso de esteroides (CATLIN et al., 1987; CATLIN; MURRAY, 1996).

Rapidamente o uso de esteroides passou dos esportistas profissionais para os amadores (TUCKER, 1997). O uso cresceu no meio dos atletas profissionais e dos praticantes de musculação sempre baseado nas vantagens do uso de tais substâncias (INTERNATIONAL SOCIETY OF SPORT PSYCHOLOGY, 1993).

Os avanços tecnológicos nos testes antidopings para anabolizantes e a introdução dos testes fora da época de competição (maior período de uso) tem se mostrado eficiente no controle do uso dos anabolizantes. Porém, o uso de testes fora das competições é restrito a poucos países, estando em período probatório em muitos outros (MOTTRAM; GEORGE, 2000).

2.4 USO TERAPÊUTICO DE ANABOLIZANTES

EAA são considerados medicamentos a base do hormônio masculino, sintetizado para que se obtenha o mesmo efeito da testosterona, podendo ser administrado na forma de comprimido, injeção intramuscular (SANTOS, 2007) ou na forma de filmes de testosterona aplicados sobre a pele do escroto, permitindo a manutenção da concentração plasmática em níveis normais (THEIN et al., 1995; SABINO, 2007).

No entanto, as mais variadas formas de administração já foram descritas, como a administração via retal, nasal e transdérmica, ou implante de cápsulas, sempre visando burlar o metabolismo da droga durante a primeira passagem pelo fígado (PARKINSON; EVANS, 2006).

Os EAA foram produzidos inicialmente com o intuito de serem utilizados em indivíduos do sexo masculino com deficiência androgênica em casos onde os testículos foram removidos, em cânceres de testículo, retardo na puberdade, sempre visando o desenvolvimento e manutenção das características secundárias masculinas. Hoje tem seu uso consolidado para tratar algumas doenças e distúrbios, tais como: alguns tipos de cânceres, osteoporose, hipogonadismo, estados catabólicos (raquitismo, HIV e graves queimaduras), deficiências nos níveis de testosterona, problemas nos testículos, micropênis neonatal, contracepção hormonal masculina, anemia por falhas na medula óssea ou nos rins (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002; CONWAY et al., 2000; KENNEDY, 2000).

Também são descritos uso da terapia androgênica no tratamento da fadiga em pacientes com doenças renal crônica submetidos à diálise (JOHANSEN et al., 1999), na sarcopenia relacionada à cirrose alcoólica, à doença obstrutiva pulmonar crônica, assim como em problemas associadas a algumas síndromes genéticas, como a baixa estatura devida à Síndrome de Turner e efeitos sobre a fraqueza muscular em pacientes com a distrofia muscular de Duchenne (COWART, 1989; FENICHEL et al., 2001).

O tratamento com esteroides anabolizantes também é indicado para mulheres em alguns casos específicos, como o infantilismo sexual, onde meninas falham em secretar estradiol, progesterona e testosterona, tendo amenorreia e falta de libido, além de pelos púbicos e axilares. A libido só é recuperada com o uso de testosterona (MOTTRAM; GEORGE, 2000). Mulheres que sofrem com diminuição de libido pós-parto ou pós-menopausa também podem ser tratadas com testosterona, em ambos os casos, o tratamento não deve ser prolongado devido aos efeitos masculinizantes destas substâncias (GREENBLATT; CHADDHA; TERAN, 1985).

Normalmente, na medicina, o uso de anabolizantes se dá por sua capacidade de inibir o catabolismo proteico e de regeneração muscular, após queimaduras graves ou outros estados debilitados (MOTTRAM; GEORGE, 2000).

2.5 EFEITOS COLATERAIS DEVIDO AO ABUSO DE EAAs

O uso abusivo de esteroides anabolizantes é um dos assuntos mais controversos da atualidade. Vários efeitos colaterais são conhecidos, mas pouco se sabe sobre a dose

que leva a tais efeitos, se o tempo de utilização influencia diretamente no nível desses efeitos ou se desde a primeira dose o usuário já começa a senti-los.

Faltam estudos que relacionam esses quesitos, tão difíceis de observar no ser humano devido principalmente à mistura de substâncias anabólicas ingeridas e os diferentes tipos de ciclos feitos pelos usuários (a maior parte “criada” dentro das academias, sem um devido profissional e muito menos com os devidos exames laboratoriais necessários para se começar um tratamento com EAA).

O risco está principalmente na falta de informação, na educação de baixa qualidade. O risco de complicações aumenta, pois geralmente os usuários associam vários agentes anabólicos, resultando em uma combinação de respostas e efeitos. A prevalência dos efeitos colaterais se mostra diretamente relacionada ao tipo de esteroide utilizado, a idade e o sexo do usuário e ao uso prolongado da droga (PARSSINEN, 2000; SADER, 2001). Entre os adolescentes e as mulheres os efeitos são ainda menos conhecidos.

Para efeito de comparação, as doses consideradas terapêuticas, que constam nas bulas desses medicamentos, também apresentam efeitos adversos. Na bula do anabolizante Deposteron® (Cipionato de Testosterona) são relatados como efeitos adversos mais frequentes: virilização e irregularidades menstruais em mulheres, ginecomastia, irritabilidade da bexiga e epididimite em homens. Em ambos os sexos os efeitos mais comuns citados incluem edema, eritrocitose, irritação gastrointestinal, hipercalcemia e policitomia, alopecia androgênica, seborreia e acne. Além desses, a bula traz como efeitos adversos mais raros constipação, náusea, diarreia, infecção, vermelhidão, dor ou irritação no local da injeção, alterações da libido, dor estomacal, dificuldade no sono, impotência, atrofia testicular, cefaleia, ansiedade, depressão, apneia do sono e parestesia generalizada (BULA DEPOSTERON®).

A bula do anabolizante Winstrol Depot® (Stanozolol) cita como advertências os efeitos masculinizantes, o fechamento epifisário precoce e a presença de substâncias que podem ser constatadas em exames de doping. Em relação aos efeitos adversos, cita como raros e sempre reversíveis os efeitos de náusea, vômitos, excitação, insônia e acne (BULA WINSTROL DEPOT®).

Muitos efeitos já foram descritos repetidamente e parecem estar diretamente relacionados a o uso dos esteroides anabolizantes. A retenção hídrica é um mecanismo

frequente na utilização de anabolizantes, pois os mesmos provocam uma redução da eliminação urinária de sódio, potássio e cloro (TAKAHASHI; TATSUGI; KOHNO, 2002).

No sistema genital masculino temos a redução dos níveis de testosterona endógena, a atrofia testicular, alterações na morfologia do espermatozoide (oligospermia e azoospermia), dificuldades para urinar, infertilidade, carcinoma prostático, hipertrofia prostática e hipogonadismo gonadotrófico, além da ginecomastia (THEN et al., 1995; JIN et al., 1996; POPE; KATZ, 2003; EVANS, 2004).

Nas mulheres, é comum o aparecimento de caracteres secundários masculinos, como alterações na voz, atrofia uterina, diminuição da gordura corporal, irregularidades menstruais, alteração da libido, atrofia mamária, hipertrofia do clitóris e amenorreia, além da pilificação acentuada (HATFIELD, 1986; DE ROSE; NOBREGA, 1999; LISE, 1999; WILSON, 1999; KYSELOVICOVA; ANTALA; MICHALAK, 2008).

Também são descritos alguns efeitos do ponto de vista endócrino. Os mais comuns são as alterações no metabolismo de carboidratos, com resistência à insulina e intolerância à glicose, alteração do perfil de hormônios tireoidianos, com diminuição na liberação de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), além da diminuição do hormônio estimulante da tireoide pela hipófise (DAWSON, 2001; SHAHID, 2001; TAKAHASHI; TATSUGI; KOHNO, 2002).

Para o sistema esquelético, o principal risco é o fechamento precoce das lâminas de cartilagem epifisárias que ocorre em adolescentes, e resulta em uma estatura final menor do indivíduo. Essa alteração é irreversível (CATLIN; MURRAY, 1996; BLUE; LOMBARDO, 1999). A ruptura de tendões tem sido frequentemente descrita em atletas usuários de anabolizantes, uma vez que os tendões sofrem displasia de colágeno nesses usuários, o que resulta em um tendão mais rígido e com menos alongamento (MILES, 1992).

As alterações do perfil lipídico, como o aumento do colesterol sanguíneo, aumento do LDL e diminuição do HDL (PALATINI et al., 1996; KOURI; POPE; OLIVA, 1996; ALMEIDA, 2010) parecem estar diretamente aos efeitos cardiovasculares continuamente descritos, como infarto do miocárdio, arritmias, morte súbita, hipertensão arterial e também hipertrofia cardíaca (MELCHERT; WELDER, 1995; EVANS, 2004).

Alterações hepáticas, como hepatites, hiperplasias e adenomas hepatocelulares também foram descritas, mas são mais raras (EVANS, 2004). Algumas complicações decorrentes da própria aplicação, normalmente via parenteral, também são descritas, como inflamações, fibroses musculares, infecções e abscessos. Junto a estes efeitos, tem-se o risco de contrair HIV ou os vírus das hepatites B e C pelo uso de equipamentos não estéreis (RICH et al., 1999).

O uso abusivo de esteroides em humanos também pode causar efeitos adversos na saúde mental, como euforia, irritabilidade, hiperatividade, tensão nervosa, mudança de libido e psicose (LINDQUIST et al., 2002). Middleman et al. (1995), descreveram os anabolizantes como importantes causadores de comportamentos de riscos entre os adolescentes. O uso de EAA é relacionado a atos de agressividade (brigas e agressões), crimes contra o patrimônio, irritabilidade e hostilidade (SU et al., 1993; MIDDLEMAN et al., 1995; CORRIGAN, 1996; MARTINEZ-SANCHES et al., 1998; EVANS, 2004).

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

a) Nos efeitos imediatos são vistas a mudança de humor e a euforia: existe melhora da confiança, energia e autoestima, com aumento da motivação e do entusiasmo. Há diminuição da fadiga, insônia e habilidade para treinar com dor, irritação, raiva, agitação;

b) Os EAA, depois de administrados em altas doses por longo período, promovem a perda da inibição, com alterações de humor;

c) Os efeitos graves manifestam-se quando esses sentimentos de agressividade evoluem para comportamentos violentos, hostis e antissociais.

Corrigan (1996) também relatou outras alterações psiquiátricas associadas ao uso de EAA em atletas. Dentre elas podemos citar casos de esquizofrenia aguda vinculados ao uso do esteroide metandienona; a mania, hipomania e a confusão mental, além de paranoia e depressão, em razão do uso de oxandrolona e oximetolona.

Diversos estudos também relacionam o uso contínuo de EAA à dependência, tanto em usuários atletas como em usuários recreacionais, provocando a síndrome da abstinência quando seu uso é interrompido (BROWER et al., 1990; COPELAND; PETERS; DILLON, 2000). Quando cessado o tratamento com EAAs, os usuários relatam cansaço excessivo, insônia, diminuição da libido, dores de cabeça, mialgias,

fadiga, diminuição do apetite e depressão. Casos de suicídio já foram associados a essa abstinência de anabolizantes (ANABOLIC STEROID ABUSE & UNITED STATES ANTIDOPING AGENCY apud DOTSON; BROWN, 2007).

Porcerelli e Sandler (1995) vincularam o uso de EAA ao narcisismo patológico em fisiculturistas e levantadores de peso.

De acordo com Damião et al. (2012), houve alterações significativas na quantidade de corpos de neurônios no córtex cerebral de animais tratados com esteroides anabolizantes (30%) quando comparados aos animais do grupo controle. A diferença entre os anabolizantes utilizados não foi significativa.

2.6 PREVALÊNCIA DO USO DE EAAs NO BRASIL E NO MUNDO

Muitos estudos, no Brasil e no mundo, vêm tentando traçar um perfil do uso de EAA. No Ofício número 201, da Confederação Brasileira de Culturismo e Musculação (COFEN, 1998), no Brasil, encontramos o uso indevido de fármacos com finalidades anabolizantes, essas substâncias são vendidas livremente nas farmácias ou obtidas em farmácias de manipulação. Além destes fármacos, observamos a utilização abusiva de substâncias destinadas a uso veterinário, principalmente para equinos de competição, visando à mesma finalidade anabolizante. Produtos importados ilegalmente, muitos derivados de perigosas falsificações, são comercializados livremente no país, o que, além de colocar em risco a saúde dos usuários destes produtos de baixa qualidade, dificulta, e até mesmo inviabiliza, o controle correto pelos órgãos oficiais.

Dados do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) coletados nas últimas décadas mostram o assustador aumento no consumo das drogas consideradas como “drogas da imagem corporal” entre os frequentadores de academias de ginástica. E o problema não se resume apenas a atletas e pessoas que buscam um corpo escultural, a grande preocupação está nos usuários menos estudados, como os adolescentes e as mulheres. Ainda faltam, no Brasil, estudos sobre o uso de esteroides para fins esportivos ou mesmo estéticos. Alguns estudos quantitativos realizados descrevem um grande consumo dessas substâncias entre praticantes de musculação, incluindo o uso de produtos veterinários, em academias de São Paulo, Rio de Janeiro,

Porto Alegre e Goiás (IRIART; ANDRADE, 2002; SABINO, 2002; SILVA et al., 2007).

Nos Estados Unidos, um estudo realizado mostrou que 6,6% dos estudantes do sexo masculino avaliados tinham feito uso de esteroides pelo menos uma vez durante suas vidas, desses, 65% admitiram ter participado de escolas patrocinadoras de atletismo, futebol ou beisebol (WALKER; ADAMS, 2009). Cerca de 6% dos alunos do ensino médio estadunidense, jogadores de futebol, assumiram ter utilizado EAA. Quando observado o uso dentre os universitários do mesmo país, o índice de uso entre os atletas subiu para cerca de 20% (STILGER; YESALIS, 1999).

É estimado que mais de um milhão de estadunidenses abusam ou abusaram de EAAs (HOBERTMAN; YESALIS, 1995; EVANS, 2004). Um estudo conduzido pelo National Institute on Drug Abuse, em 2004, registrou que 1,5% (anterior em 1999 tinha sido de 3%) dos estudantes do país (high school seniors) admitiram utilizar EAAs. Os valores reais são difíceis de obter, uma vez que poucos atletas assumem o uso de substâncias proibidas em seus esportes (DOTSON; BROWN, 2007).

Ainda nos Estados Unidos da América, 50% dos usuários utilizam EAA por via intramuscular, sendo que 20% destes compartilham a seringa, o que aumenta e muito a chance de contrair alguma doença infectocontagiosa (RICH et al., 1999).

2.7 CÓRTEX CEREBRAL

O córtex cerebral é a fina camada de substância cinzenta que reveste o centro branco medular do cérebro. Possui uma estrutura complexa e heterogênea, constituída de neurônios, células neurogliais e fibras. Ao córtex chegam impulsos provenientes de todas as vias de sensibilidade, onde se tornam conscientes e são interpretados. Do córtex saem os impulsos nervosos que iniciam e comandam os movimentos voluntários, sendo relacionado também com os fenômenos psíquicos (MACHADO, 2014).

Por sua morfologia complexa, o córtex recebe desde classificações anatômicas e cito arquiteturas até a funcional. As áreas funcionais do córtex cerebral são divididas em Áreas Primárias (de projeção) e as de Associação, subdividida em Secundárias e Terciárias. As áreas de projeção possuem as fibras relacionadas diretamente com a

motricidade e a sensibilidade, enquanto as áreas de associação estão mais relacionadas ao processamento complexo de informações (MACHADO, 2014).

As áreas motoras e sensitivas das Áreas de Projeção do córtex possuem como característica morfológica principal, respectivamente, o predomínio de células piramidais e granulares (BONINI; FERRARI, 2011).

2.8 HIPOCAMPO

Com seu nome derivado de seu formato curvo, semelhante a um cavalo marinho, (do grego hippos = cavalo e kampi = curva), o hipocampo é um importante componente do sistema límbico. Localizado nos lobos temporais, mais especificamente no assoalho do corno inferior do ventrículo lateral, acima do giro para-hipocampal, sendo composto por arquicórtex (ESPERIDIÃO-ANTONIO et al., 2007).

Tem sido relacionado em estudos à consolidação da memória, e não como local de armazenamento das mesmas. Por meio de um estudo com pacientes que tiveram seu hipocampo removido, cientistas observaram que estes só se lembravam de histórias do passado, mantendo suas memórias de longo prazo intactas. Enquanto os fatos ocorridos antes da cirurgia e depois não eram lembrados, são as amnésias retrógradas e anterógradas, respectivamente. Mantendo intacta a memória operacional e a memória de longo prazo, conclui-se que o hipocampo participa diretamente do processo de consolidação da memória, mas que não é o local de armazenamento da mesma (MACHADO, 2014).

2.9 MEMÓRIA

O sistema inicial de processamento da memória decorre de múltiplos subcomponentes (visual-espacial, fonológico, centro executivo) que receberão as informações das diferentes vias sensoriais, para serem processadas em curto período de tempo (BADDELEY, 1998). Esse processo rápido é conhecido como memória operacional ou de trabalho e ocorre no córtex pré-frontal e parte do giro do cíngulo, sendo responsável por um armazenamento transitório da informação, como para

compreender uma pergunta e elaborar uma resposta, memorizar o que acabou de ser lido para compreender a frase seguinte, memorizar um número de telefone durante o tempo até discá-lo (ATKINSON; SHIFFRIN, 1986; BADDELEY, 1992; MACHADO, 2014).

Para que essa informação “transitória” se torne estável é necessário que ocorra um processo de consolidação da memória, que pode ser de uma memória de curto prazo (minutos ou algumas horas) ou uma memória de longo prazo (muitas horas, dias ou anos). A memória de curto prazo dura de 3 a 6 horas, tempo necessário para consolidação da memória de longo prazo (Squire, 1992; Izquierdo et al, 1998; Izquierdo 2008). Essa forma mais estável da memória é decorrente de plasticidade, fenômeno no qual ocorre o prolongamento neuronal e a formação de novas conexões sinápticas. A plasticidade de curto prazo envolveria somente alterações covalentes de proteínas pré-existentes, ao passo que a plasticidade de longo prazo requer alterações na expressão gênica e síntese de novas proteínas, para o estabelecimento de novas conexões (FREY et al., 1993; BAILEY et al., 1999; SCHAFFER et al., 2001).

As memórias também podem ser classificadas em memórias declarativas ou explícitas e não declarativas ou implícitas (MACHADO, 2014).

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

Já a memória implícita, conhecida como memória de hábitos, é uma memória sujeita a responder a estímulos através da prática. Esse processo inclui a capacidade para detectar ou identificar objetos como resultado de contatos anteriores recentes, um fenômeno conhecido como *priming*. (SQUIRE et al., 1993). As memórias implícitas incluem tarefas de habilidades motoras (andar de bicicleta ou nadar) e de percepção (esquivar-se de um choque elétrico ao ouvir um som sinalizador), estudadas em testes de condicionamento clássico, operante e memórias associativas, que são memórias exercidas de maneira automática e inconsciente.

2.10 ANSIEDADE

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

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

Segundo Graeff e Del-Bem (2008), no transtorno de ansiedade, mesmo com o motivo não presente, há ativação da amígdala e liberação do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, induz a liberação de cortisol pela adrenal. O hipotálamo, inibidor do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ao ser exposto continuamente ao cortisol pode ser lesado, causando morte dos neurônios hipocampais. Assim, a degeneração do hipocampo torna a resposta ao estresse mais acentuada, o que consequentemente leva a maior degradação do hipocampo. Sabendo-se que o hipocampo tem papel central na consolidação das memórias, o estresse vai, com o tempo, afetar a memória.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos relatam que os anabolizantes possuem efeitos adversos que variam desde alterações em parâmetros comportamentais, como ansiedade e agressividade (CORRIGAN, 1996; MARTINEZ-SANCHEZ et al., 1998), até problemas em órgãos e sistemas do corpo, como fígado, rins e coração (LINDQUIST et al., 2002; EVANS,2004). Estudos recentes demonstraram que os anabolizantes possuem efeito deletério sobre o número de corpos de neurônios no córtex cerebral de camundongos (DAMIÃO et al., 2012).

Os problemas se agravam com o crescente número de medicamentos falsos apreendidos no Brasil a cada ano, sendo os anabolizantes a segunda classe de medicamentos mais falsificados no país, ficando atrás apenas dos medicamentos utilizados para tratar a disfunção erétil masculina (AMES; SOUZA, 2012).

Com o aumento do uso de substâncias anabolizantes, principalmente entre adolescentes e adultos jovens (NORTON; OLDS, 2001; SILVA et al., 2007), a questão antes vista apenas como um problema restrito ao meio desportivo passa a ser considerado um problema de saúde pública (SILVA et al., 2007; MARTIN; DAYYEH; CHUNG, 2008). Assim, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos dos anabolizantes quando consumidos indevidamente, sem o acompanhamento médico necessário.

4 OBJETIVOS

Os objetivos gerais consistem em:

- Avaliar os efeitos morfofuncionais dos esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) em neurônios das regiões corticais e hipocampais de camundongos.

Os objetivos específicos consistem em:

- Observar alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e à memória e também à capacidade de locomoção dos animais;

- Analisar o número, por área, dos perfis de corpos celulares de neurônios no córtex límbico, motor e sensitivo, além de áreas hipocampais (CA1, CA2 e CA3), buscando alterações quantitativas dos mesmos, devido ao tratamento com esteroides.

5 MATERIAL e MÉTODOS

O trabalho consistiu de um estudo experimental, realizado no Departamento de Anatomia (Danat) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), mais especificamente no Laboratório de Estereologia, Morfometria e Morfologia (LEMM).

5.1 ANIMAIS

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

No início dos experimentos o peso corpóreo inicial dos animais variava em torno de 40 a 50 gramas e o mesmo foi acompanhado semanalmente, sendo aferido todas as segundas-feiras ao longo do tratamento. O presente experimento conta com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-Unifal-MG) sob registro nº 414/2012 (Anexo A).

5.2 TRATAMENTO

Consistiu na aplicação via intraperitoneal (IP) de dois esteroides anabolizantes: o primeiro, comercializado com o nome de Winstrol Depot® (Stanozolol) e o segundo, comercializado com o nome de Deposteron® (Cipionato de Testosterona), nas doses conforme a Tabela 1. Os animais foram tratados durante 30 dias, com aplicações realizadas duas vezes na semana (terças e quintas-feiras). Totalizando 8 aplicações.

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

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

Fonte : do autor.

As doses utilizadas foram calculadas pelo Método de Extrapolação Alométrica (MAHMOOD, 2007) a partir das doses utilizadas por usuários frequentadores das academias. Em um primeiro instante a dose extrapolada foi letal (DL) e após adequação obtivemos uma dose suprafisiológica não letal para os animais.

Os animais foram submetidos à natação por 15 minutos, todas as segundas, quartas e sextas-feiras durante o período de tratamento. A natação foi realizada em um recipiente de plástico medindo 43x34x26cm (Figura 1), contendo em seu interior água na temperatura entre 24 e 26 °C até perto da borda, de modo que os animais não conseguiram tocar o fundo do recipiente e nem escalar suas paredes laterais, não conseguindo sustentar seu peso com as patas. Totalizando 11 dias de treinamento.

Figura 1 - Caixa plástica utilizada para a natação.



Fonte : do autor.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

A análise comportamental foi realizada para analisar parâmetros relacionados à ansiedade, retenção de memória de curto prazo e à atividade locomotora dos animais. Para isso, utilizamos os testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Memória e Reconhecimento de Objetos e Campo Aberto.

5.3.1 Análise de Ansiedade

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um método bem conhecido para detectar o efeito de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas e foi usado como modelo de avaliação de ansiedade nesse estudo.

O teste do labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos (50 x 10cm cada), dois braços fechados (50 x 10 x 40cm cada) e uma plataforma central (10 x 10cm) formando uma cruz suspensa à 50cm de altura (Figura 2). Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: número de entradas nos braços abertos e nos fechados (com as 4 patas) e o tempo de permanência dos animais nestes braços. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Figura 2 - Labirinto em cruz elevado (LCE).



Fonte : do autor.

5.3.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi adaptado do modelo descrito anteriormente por Abe et al. (2004). Este teste foi dividido em três (3) sessões: familiarização, teste e experimento. A sessão de familiarização foi realizada duas horas antes da próxima etapa, onde foi permitida a cada camundongo a exploração do ambiente no qual foram realizados os testes, com o intuito de promover a familiarização do animal com local. O ambiente consiste em uma caixa de madeira (65 x 45 x 45 cm) forrada com maravalha (03 cm de altura) (Figura 3). A sessão de teste foi à filmagem da exposição de dois (2) objetos idênticos (A1 e A2) a cada animal, no ambiente descrito acima por 5 minutos. Os objetos foram deixados no canto oposto do local onde o camundongo foi colocado. Foi mensurado o tempo gasto na exploração dos objetos A1 e A2 pelo camundongo pela análise do vídeo. Na fase de experimento, os objetos foram trocados por um terceiro (A3) objeto também idêntico aos 2 anteriores e por um quarto objeto (B) totalmente diferente, porém de volume semelhante. Os objetos da fase de experimento foram colocados no mesmo lugar dos objetos da fase teste e o camundongo foi exposto aos objetos e filmado por 5 minutos. Foi mensurado o tempo gasto na exploração de cada objeto. A exploração do objeto foi definida como direcionamento do focinho ao objeto (a uma distância de pelo menos 2 cm) e toque do focinho no objeto (ABE et al., 2004).

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

$$EG = A1+A2$$

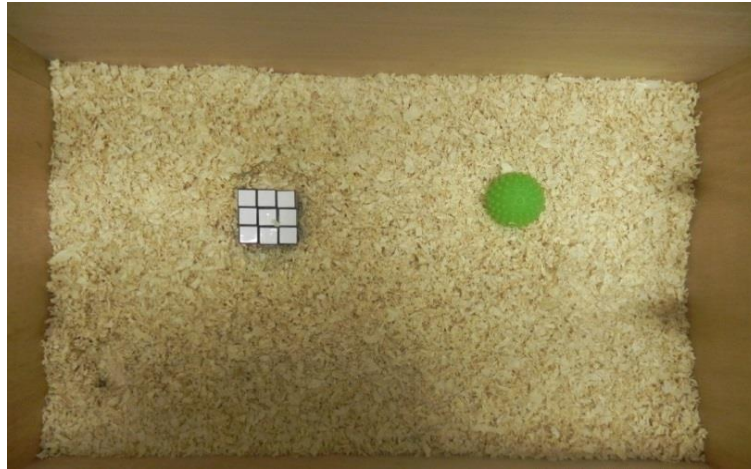
A exploração global no teste (EGT) foi definida como sendo a soma dos tempos de exploração do terceiro e quarto objeto no teste.

$$EGT = B+A3$$

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

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

Figura 3 - Memória e Reconhecimento de Objetos.



Fonte : do autor.

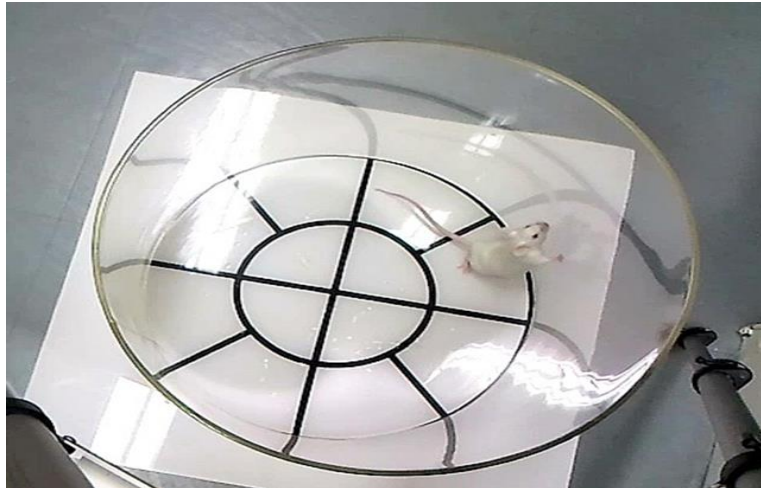
5.4.3 Atividade Motora Espontânea no Campo Aberto.

Este teste permite a avaliação da atividade motora, exploratória e da ansiedade do animal (WALSH; CUMMINS, 1976). Consiste de um aparato experimental de acrílico, na forma de uma arena circular de 30 cm de diâmetro (Figura 6), com parede transparente de 30 cm de altura e com o piso dividido em 12 áreas, 8 delas na periferia e 4 no centro. No teste, cada animal é colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise.

Os parâmetros avaliados foram:

- a) Frequência de locomoção, estimada a partir da contagem dos quadrantes nos quais o animal esteve com as quatro patas;
- b) Número de verticalizações do animal, que consiste no número de vezes em que o mesmo ficou apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, com ou sem as patas anteriores encostarem nas paredes;
- c) Permanência nos quadrantes adjacentes às paredes da arena.

Figura 4 - Campo aberto (Insight®).



Fonte : do autor.

5.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia dos animais pela inalação do anestésico Alotano®, seus encéfalos foram retirados pelo seguinte procedimento: os crânios foram abertos com o auxílio do instrumental cirúrgico e os encéfalos retirados, lavados em solução fisiológica e fixados em formaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1M. Os encéfalos permaneceram imersos nesta solução fixadora por 24 horas, seguindo o protocolo utilizado por Rabinowicz et al. (2002). Em cada encéfalo foram retiradas amostras em cortes frontais, seriadas e homotípicas (BROWN e AGGLETON, 2001) para avaliar as áreas estabelecidas para este estudo (VAN STRIEN et al., 2009) (Figura 3).

Figura 5 - Corte frontal de um cérebro de camundongo.



Fonte: do autor.

5.6 PROCESSAMENTO E COLORAÇÃO

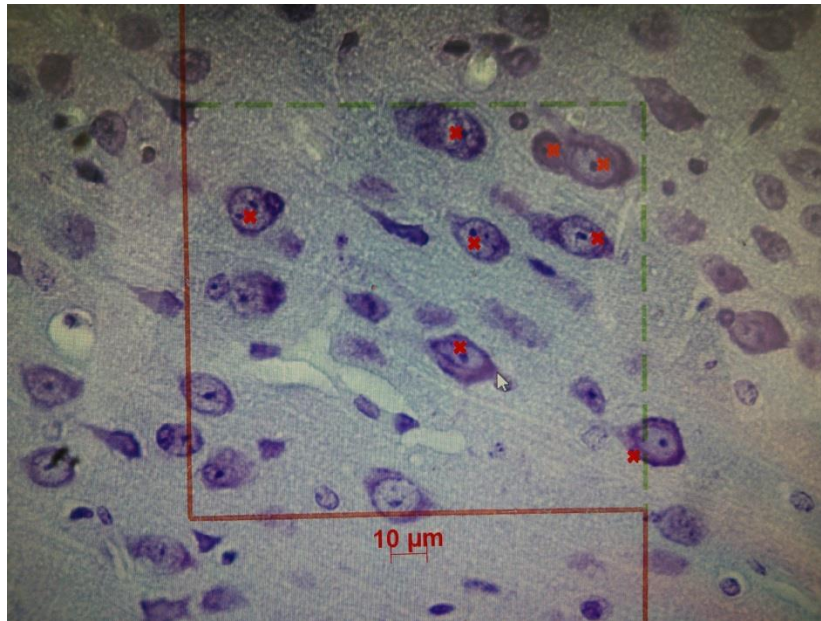
Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cada amostra com as referidas áreas a serem analisadas, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2012), foi emblocada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

5.7 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Para a estimativa da densidade por área dos perfis de corpos celulares de neurônios utilizou-se a metodologia de contagem aleatória simples (WEST, 1993a; WEST, 1993b; MANDARIN-DE-LACERDA, 1994; MANDARIN-DE-LACERDA, 2003; PAKKENBERG; GUNDERSEN, 1995). Neste método adquiriu-se 2 campos microscópicos aleatórios de 3 cortes seriados da área, totalizando assim seis (6) áreas analisadas por animal, para cada região escolhida. Nestas áreas foram marcadas 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 6). Desta forma, aferiu-se o número de células por área contada, e não o número total dessas células nas áreas corticais e no hipocampo, objetivo do presente experimento.

A análise foi feita por um Sistema de Analisador de Imagens Axiovision 4 Module Interactive Mensuerement da marca Carl Zeiss® acoplado a um microscópio AxioScope A1, também da marca Carl Zeiss® e um computador.

Figura 6 - Imagem representativa de área teste.



Fonte : do autor.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

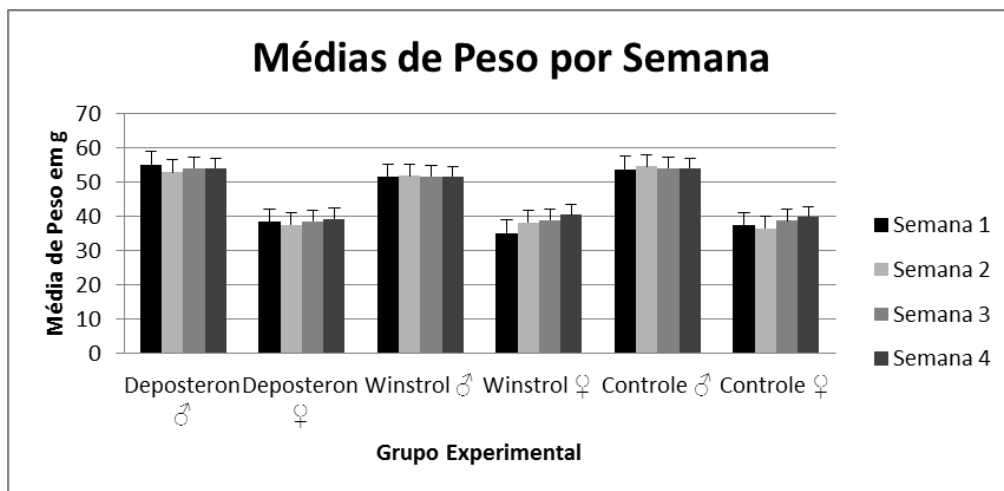
6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPÓREO

O peso inicial dos animais foi registrado no primeiro dia de tratamento (semana 1), seguindo a compilação dos pesos no sétimo dia de tratamento (semana 2), décimo quarto dia (semana 3) e por último no vigésimo primeiro dia (semana 4). A mensuração dos pesos ocorreu todas as segundas-feiras no mesmo horário, durante o período de tratamento. Dos dados coletados originou-se o gráfico 1.

O gráfico 1 mostra que não houve diferenças significativas nos pesos dos animais quando comparamos os grupos tratados com anabolizantes em relação ao grupo controle, tanto em machos quanto em fêmeas.

Gráfico 1: Média dos pesos em gramas (g).



Fonte: do autor.

6.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise comportamental mostrou alterações nos parâmetros relacionados à ansiedade, mas não alterações relacionadas à atividade locomotora ou à memória dos animais.

6.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

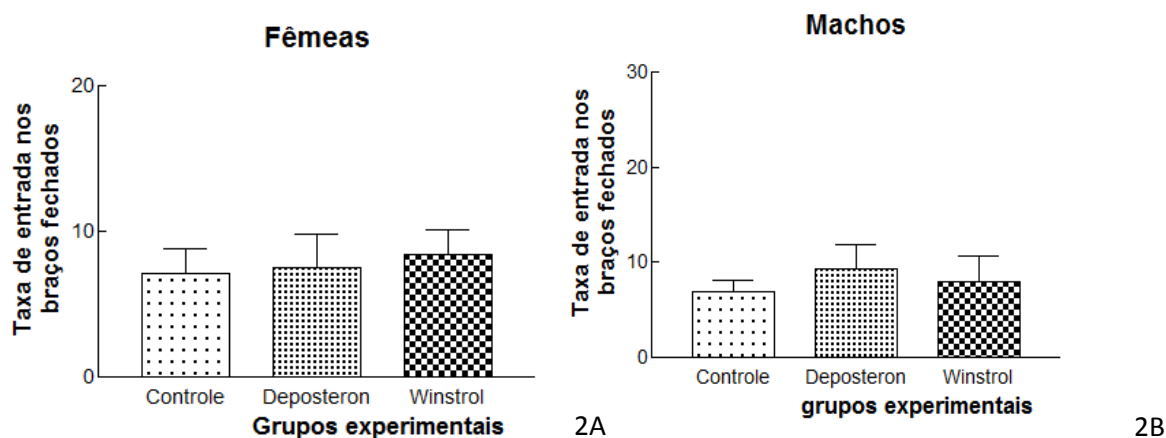
O teste do labirinto em cruz elevado, utilizado para averiguar parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, foi realizado logo após o término do tratamento. Cada animal foi submetido somente uma única vez a este teste comportamental, sendo colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados e então, observado durante 5 minutos (PELLOW et al., 1985; SETEM, 2000; MARCONDES et al., 2001).

De acordo com os gráficos 2A e 2B, apresentados abaixo, não houve diferenças significativas na taxa de entrada nos braços fechados, assim como, não houve diferenças significativas na taxa de entrada nos braços abertos nas fêmeas quando comparado o grupo controle com os grupos experimentais. A taxa de entrada nos braços fechados, estatisticamente igual entre os animais, é um parâmetro indicativo da atividade locomotora dos animais, mostrando que não houve alteração na mesma. A taxa de entrada nos braços abertos, parâmetro relacionado com a ansiedade, não apresentou alterações.

As taxas de entrada nos braços fechados e abertos, para os machos, representadas nos Gráficos 2B e 3B, mostram que não houve alterações no que diz respeito à taxa de entrada nos braços fechados, não havendo comprometimento ou alterações na atividade locomotora desses animais, enquanto a taxa de entrada nos braços abertos se mostrou estatisticamente significativa quando comparamos o grupo controle ao grupo tratado com Winstrol Depot®, sendo que este último sofreu uma redução no número de entradas nestes braços do aparato, indicativo de aumento nos parâmetros relacionados à ansiedade. Os resultados referentes à atividade locomotora, representados neste teste pela quantidade de entradas nos braços fechados do aparato foram comprovados com o teste do Campo Aberto, descrito adiante.

Gráfico 2 - 2A-Taxa de entrada nos braços fechados do LCE das fêmeas.

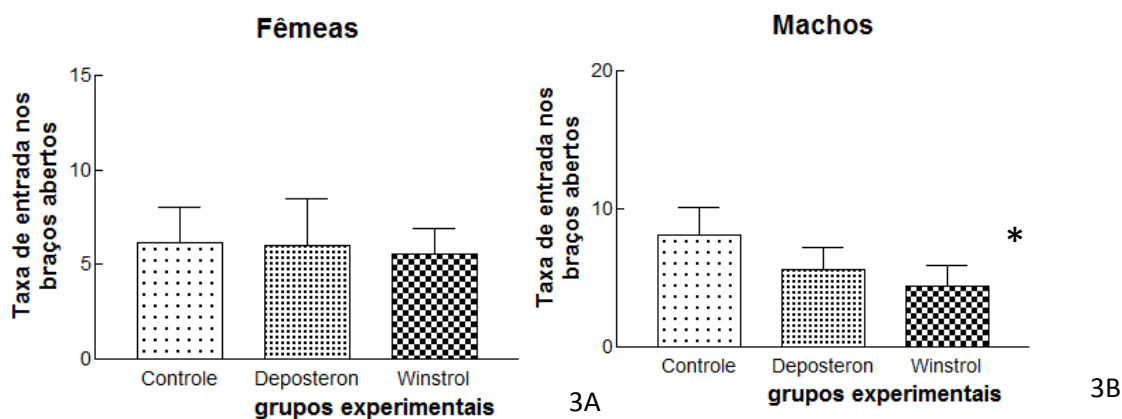
2B- Taxa de entrada nos braços fechados do LCE dos machos.



Fonte : do autor.

Gráfico 3 - 3A-Taxa de entrada nos braços abertos do LCE nos animais fêmeas.

3B- Taxa de entrada nos braços abertos do LCE nos animais machos.



Sendo : * = Resultado significativo ($p < 0,05$).

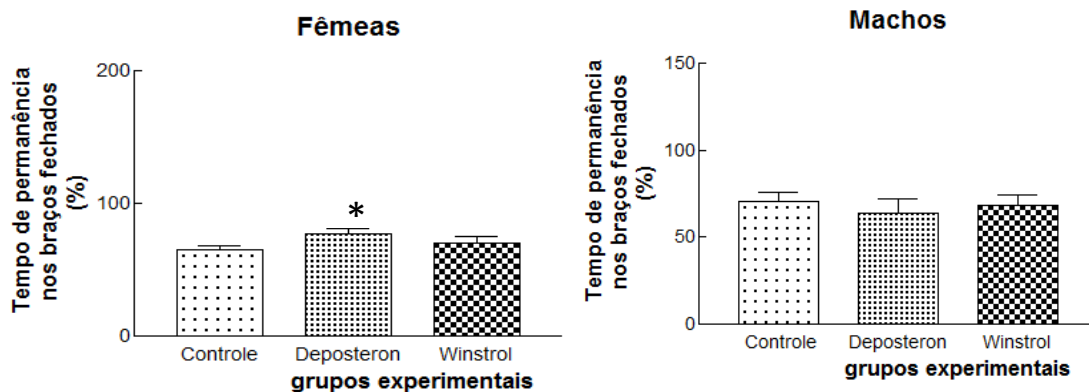
Fonte : do autor.

Já os resultados referentes ao tempo de permanência nos braços fechados e nos braços abertos do aparato das fêmeas, mostrou ser significativo para o grupo tratado com Deposteron® em relação aos outros grupos como demonstra os gráficos 4A e 5A. O tempo despendido pelas fêmeas do grupo Deposteron® nos braços abertos e fechados reforçam a ideia de um efeito ansiogênico deste anabolizante, uma vez que a diminuição no tempo de permanência nos braços abertos do aparato e aumento no tempo de permanência nos braços fechados é indicativa de aumento nos níveis de ansiedade.

Quando analisado o tempo de permanência nos braços fechados do LCE nos grupos de animais machos observou-se que não houve alterações no tempo despendido pelos animais dos grupos experimentais quando comparados com os animais do grupo controle (Gráfico 4B). Enquanto que, o tempo de permanência nos braços abertos do LCE demonstrou diferença significativa quando comparamos o grupo experimental tratado com Winstrol Depot® com o grupo controle, mas não com o outro grupo experimental (Gráfico 5B), mostrando que houve um aumento nos níveis de ansiedade deste grupo. Frisando novamente, a não alteração no número de entradas nos braços fechados, em ambos os grupos experimentais (machos e fêmeas), mostrado no Gráfico 2A e 2B, é um indicativo de que as alterações constatadas não dizem respeito à atividade locomotora dos animais e sim apenas aos níveis de ansiedade.

Gráfico 4 - 4A-Tempo de permanência nos braços fechados do LCE das fêmeas.

4B - Tempo de permanência nos braços fechados do LCE dos machos.



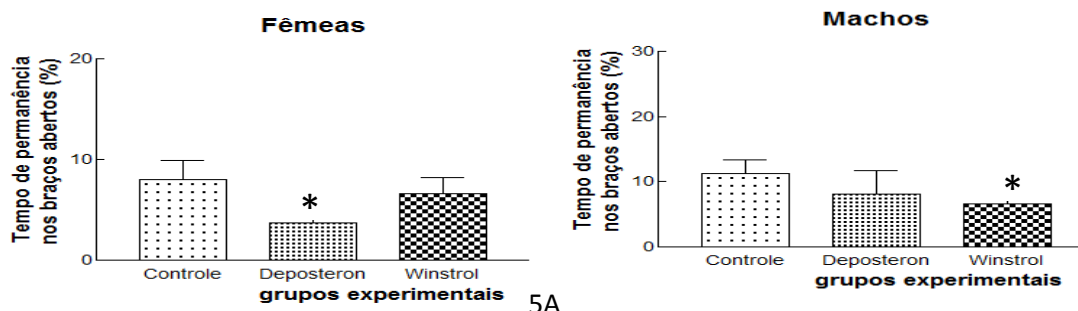
4A

4B

Sendo: * = Resultado significativo ($p < 0,05$).

Fonte: do autor.

Gráfico 5 - 5A - Tempo de permanência nos braços abertos do LCE das fêmeas. 5B - Tempo de permanência nos braços fechados do LCE nos animais machos.



Sendo :* = Resultado significativo ($p < 0,05$).

Fonte : do autor.

6.2.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos

Para análise de memória utilizamos o teste de reconhecimento de objetos, onde os animais passam pelas etapas de familiarização, teste e experimento. Os resultados obtidos na fase de teste, entre os grupos de fêmeas e machos, estão representados no gráfico 6A e 6B, respectivamente.

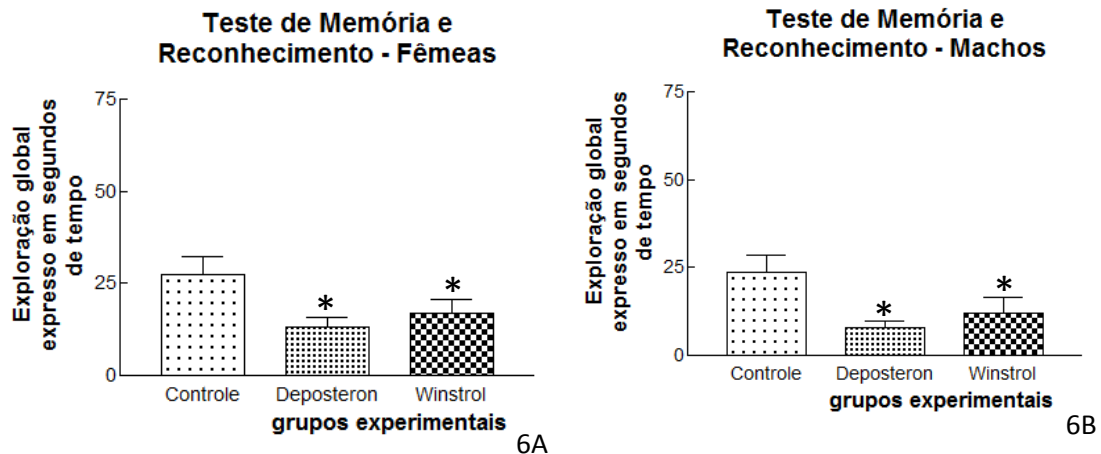
Os resultados obtidos durante a fase de experimento, exploração global teste, tanto nos machos quanto nas fêmeas estão expressos no gráfico 7. Para avaliar o reconhecimento espontâneo de objetos foi utilizada a taxa de discriminação, apresentada no gráfico 8.

Os gráficos 6A e 7A mostram que houve uma diminuição estatisticamente significativa nos tempos despendidos pelos dois grupos de fêmeas tratadas com esteroides anabolizantes na exploração global dos objetos (fase teste) e na exploração global teste (experimento), quando comparados ao grupo controle. Em ambos os casos, houve diminuição da capacidade exploratória das fêmeas em relação aos objetos A1 e A2 (gráfico 6A) e também em relação aos objetos A3 e B (gráfico 7A), resultados que demonstram um comportamento de sonolência e apatia nestes animais.

Já nos animais machos observou-se uma diminuição significativa no tempo de exploração global nos dois grupos de machos tratados com esteroides anabolizantes, como mostra o gráfico 6B, enquanto que apenas o grupo tratado com Deposteron® teve uma diminuição significativa no tempo de exploração global na fase de experimento

(gráfico 7B). Então, nos machos, o tratamento com Deposteron contribui mais para o comportamento apático e sonolento do que o tratamento com Winstrol.

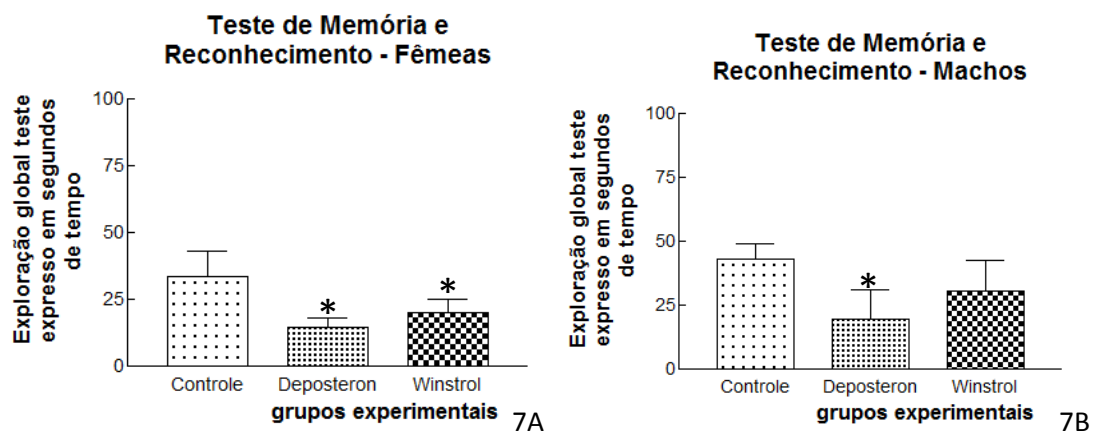
Gráfico 6 - Tempo médio gasto na exploração dos objetos 1 e 2. 6A – Exploração global das fêmeas;
6B – Exploração global dos machos.



Sendo :* = Resultado significativo ($p < 0,05$).

Fonte: do autor.

Gráfico 7 - Tempo médio gasto na exploração dos objetos 3 e 4. 7A – Exploração global teste, fêmeas;
7B – Exploração global teste, machos.



Sendo :* = Resultado significativo ($p < 0,05$).

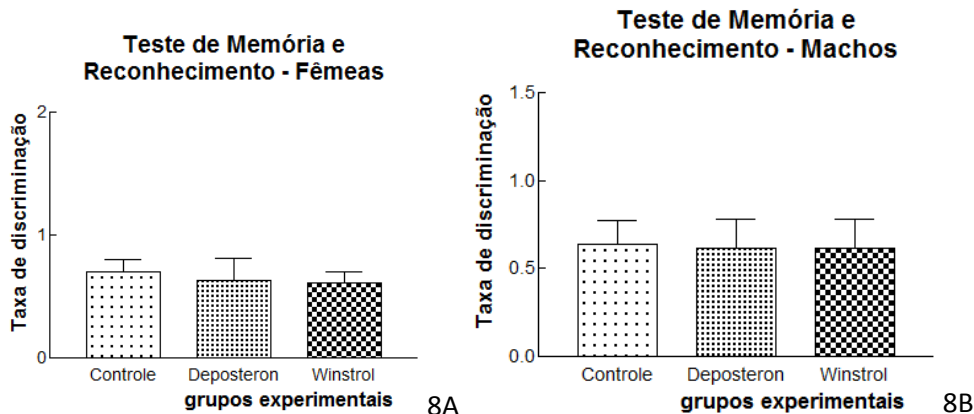
Fonte : do autor.

Em relação à taxa de discriminação, parâmetro utilizado para avaliar a retenção de memórias de curto prazo no animal, não houve diferença significativa quando

comparados os grupos tratados com anabolizantes entre si e com o controle, demonstrando que os anabolizantes utilizados não surtiram efeito sobre a capacidade dos animais reconhecerem um objeto (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Taxa de discriminação. 8A – Taxa de discriminação, fêmeas;

8B – Taxa de discriminação, machos.



Fonte : do autor

6.2.3 Campo Aberto: Atividade Motora Espontânea

O teste do Campo Aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, mas também pode ser usado para medir parâmetros relacionados à ansiedade. Os resultados obtidos mostraram que não houve alterações significativas na quantidade de vezes que os animais dos grupos de fêmeas tratadas com EAAs cruzaram os quadrantes internos e externos do aparato, representados nos Gráficos 9A e 10A respectivamente, quando comparadas às fêmeas do grupo controle. O número total de cruzamentos, que representa a quantidade de vezes que o animal cruza as linhas entre os quadrantes do aparato com as quatro patas, também não se mostrou alterado quando comparados aos valores obtidos pelo grupo controle (Gráfico 11A). Estes resultados mostram que não houve alterações na atividade locomotora das fêmeas tratadas com EAAs.

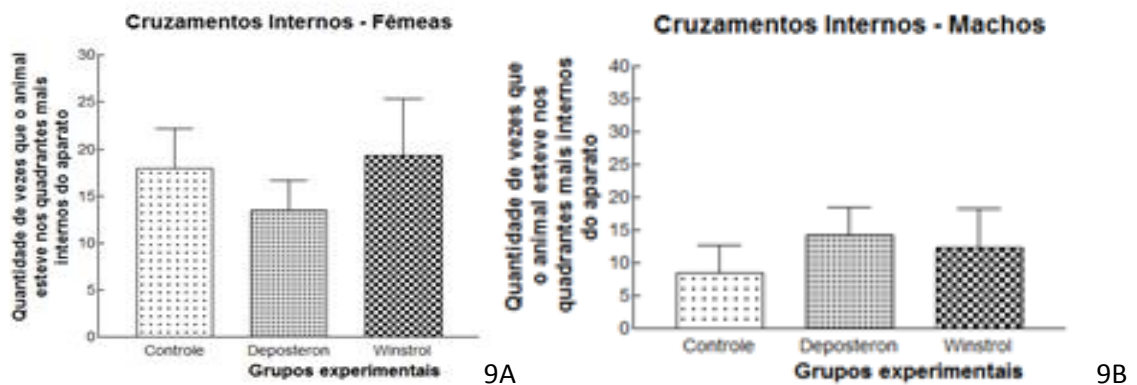
Os Gráficos 9B e 10B mostram, respectivamente, que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de vezes que os animais machos dos grupos tratados com EAAs estiveram nos quadrantes do centro e nos quadrantes da periferia do

aparato. O Gráfico 11B, ao demonstrar que também não houve diferenças na quantidade de vezes em que os animais dos grupos experimentais cruzaram de um quadrante para o outro, com as quatro patas, quando comparados aos animais do grupo controle, confirma que não foram encontradas alterações na atividade locomotora dos animais machos tratadas com anabolizantes.

O número de rearings ou verticalizações, apresentados no gráfico 12, não apresentou diferença significativa quando comparados os grupos experimentais entre si ou com o grupo controle, tanto para machos quanto para fêmeas. Estes resultados, juntos à não alteração na capacidade exploratória da periferia do aparato, demonstram que não foram encontradas alterações relacionadas à ansiedade no teste do Campo Aberto.

Gráfico 9 - Número médio de vezes que os animais cruzaram os quadrantes internos do aparato.

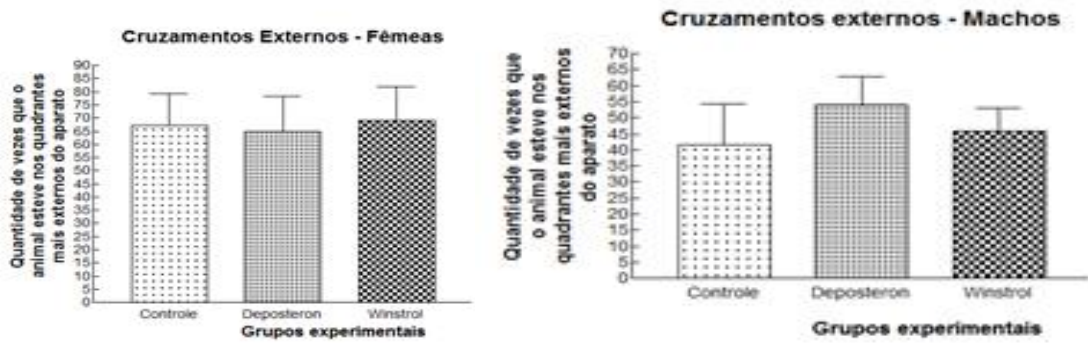
9A – Cruzamentos internos, fêmeas; 9B – Cruzamentos internos, machos.



Fonte : do autor.

Gráfico 10: Número médio de vezes que os animais cruzaram os quadrantes externos do aparato.

10A – Cruzamentos externos, fêmeas; 10B – Cruzamentos externos, machos.



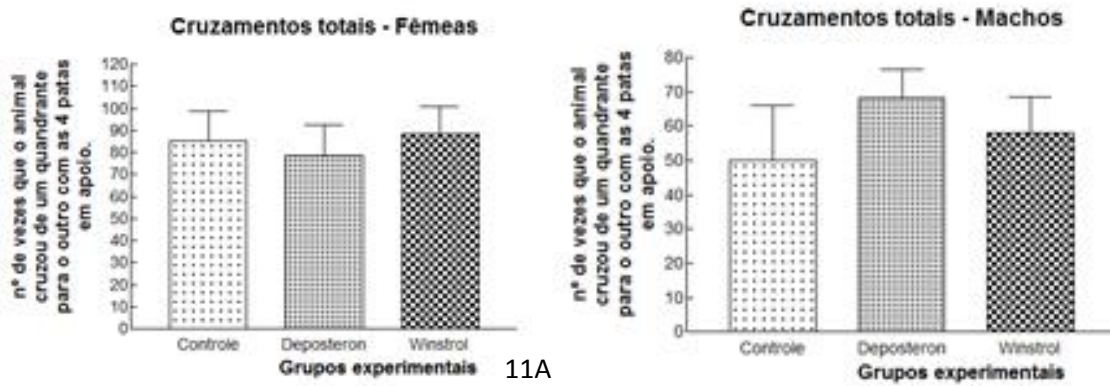
Fonte: do autor.

10A

10B

Gráfico 11 - Número médio de vezes que os animais cruzaram entre os quadrantes internos e externos do

aparato. 11A – Cruzamentos totais, fêmeas; 11B – Cruzamentos totais, machos.

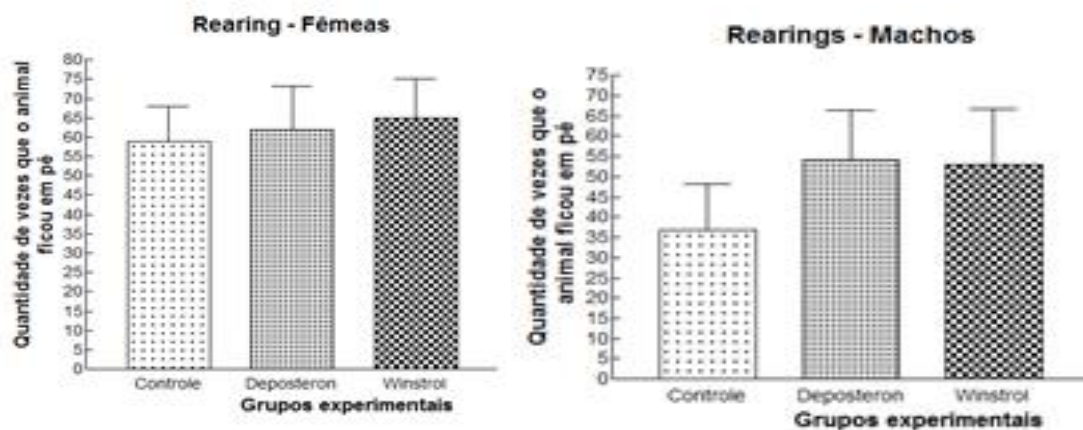


Fonte : do autor.

11A

11B

Gráfico 12 - Número médio de verticalizações. 12A – Rearing, fêmeas; 12B – Rearing, machos.



Fonte : do autor.

12A

12B

6.3 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Para a estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios foram utilizados três (3) campos microscópios idênticos em três (3) cortes consecutivos, dos hemisférios direito e esquerdo, para cada área analisada no córtex e no hipocampo dos animais. Totalizando 18 áreas analisadas para cada região e um total de 108 áreas analisadas por animal.

6.3.1 Áreas Corticais

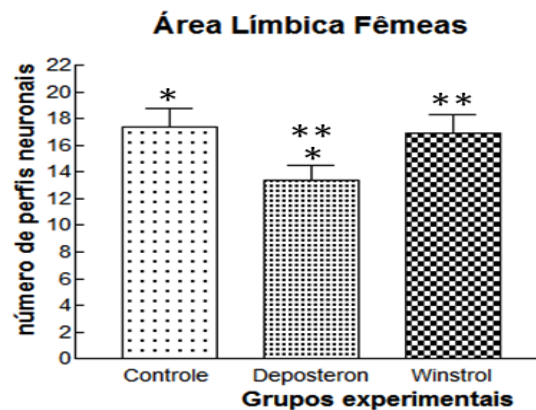
As áreas corticais analisadas foram: Área Límbica. Área Motora e Área Sensitiva.

6.3.1.1 Área Límbica

O Gráfico 13 apresenta uma diferença significativa na estimativa da densidade de perfis dos corpos celulares de neurônios na área límbica do córtex cerebral das fêmeas tratadas com esteroides anabolizantes (grupos experimentais), quando comparados entre si, sendo que o grupo tratado com Winstrol Depot® apresentou uma média de 17,86 neurônios enquanto o grupo tratado com Deposteron® apresentou uma média de 13,22 neurônios. Também houve uma diferença significativa na comparação

entre o grupo tratado com Deposteron® e o grupo controle, que apresentou uma média de 17,46 neurônios na Área Límbica do córtex cerebral. Quando comparados o grupo tratado com Winstrol Depot® e o grupo controle, não foram observadas diferenças significativas.

Gráfico 13 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área límbica nas fêmeas.



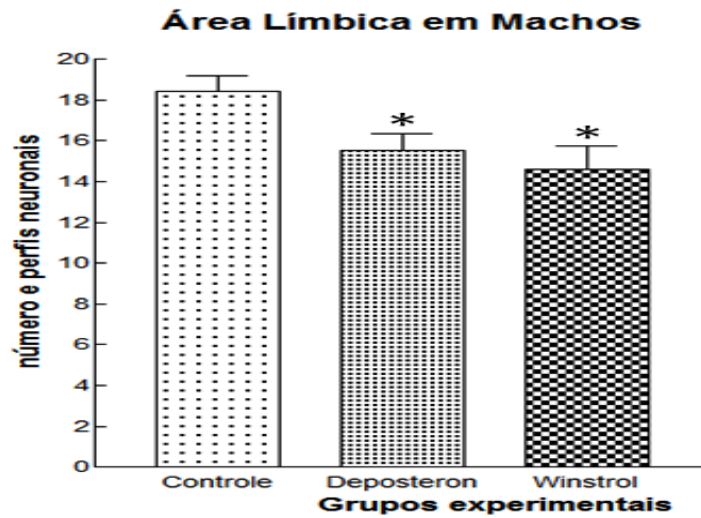
Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) do grupo Deposteron® em relação ao grupo Controle;

** = Resultado significativo ($p < 0,05$) do grupo Deposteron® em relação ao grupo Winstrol Depot®.

Fonte: do autor.

Os machos dos grupos experimentais apresentaram uma diminuição do número de perfis de corpos celulares de neurônios quando comparados ao grupo controle, mas não quando comparados entre si, gráfico 14. O grupo tratado com Deposteron apresentou uma média de 15,67 neurônios, enquanto o grupo tratado com Winstrol Depot® apresentou uma média de 14,72 neurônios e o grupo controle uma média de 18,76 neurônios.

Gráfico 14 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área límbica nos machos.



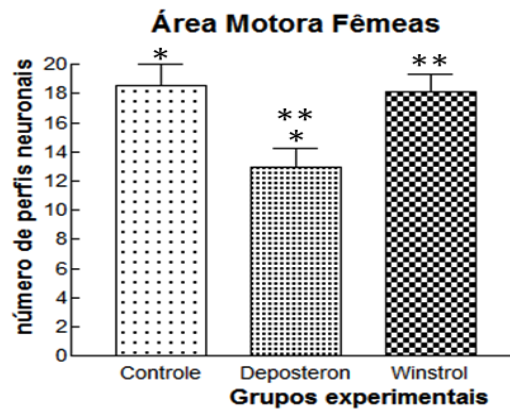
Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) do grupo controle em relação aos grupos experimentais.

Fonte: do autor.

6.3.1.2 Área Motora

O Gráfico 15 apresenta os valores médios referentes à estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da Área Motora das fêmeas. A comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle mostra que houve uma diferença significativa apenas quando comparados o grupo tratado com Deposteron® e o grupo controle, que apresentaram, respectivamente, uma média de 13,72 e 18,93 neurônios. O grupo tratado com Winstrol Depot® apresentou uma média de 17,7 neurônios, sendo estatisticamente igual ao número encontrado no grupo controle e significativamente diferente quando comparado ao grupo tratado com Deposteron®.

Gráfico 15: Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área motora nas fêmeas.



Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo

Deposteron®;

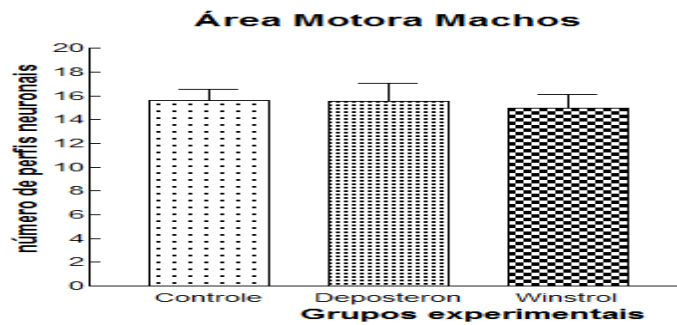
** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Deposteron® em relação

ao grupo Winstrol®.

Fonte: do autor.

A estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios não mostrou resultado significativo na área motora dos grupos experimentais de machos quando comparados ao grupo controle ou quando comparados entre si, de acordo com o gráfico 16. O grupo controle apresentou uma média de 15,79 neurônios, enquanto o grupo tratado com Deposteron® apresentou uma média de 15,19 e o grupo tratado com Winstrol uma média de 14,46 neurônios.

Gráfico 16 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área motora nos machos.

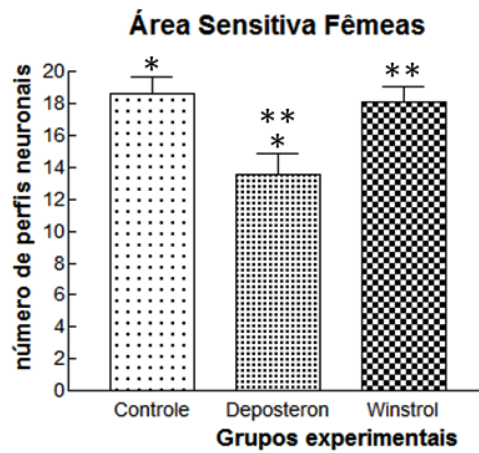


Fonte: do autor.

6.3.1.3 Área Sensitiva

A estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios apresentou diferença significativa para a comparação entre o grupo experimental tratado com Deposteron® quando comparado ao grupo controle e também quando comparado ao grupo tratado com Winstrol Depot®, como mostra o gráfico 17. Não houve diferença significativa entre os valores obtidos pelo grupo controle e pelo grupo tratado com Winstrol Depot®. O grupo tratado com Deposteron® apresentou uma média de 13,54 neurônios, significativamente menor que a média obtida pelo grupo controle, 18,64 neurônios e também que a obtida pelo grupo tratado com Winstrol Depot®, 17,68 neurônios.

Gráfico 17 - Estimativa da Densidade dos Perfis de Corpos Celulares de Neurônios da Área Sensitiva (cortical), Fêmeas.



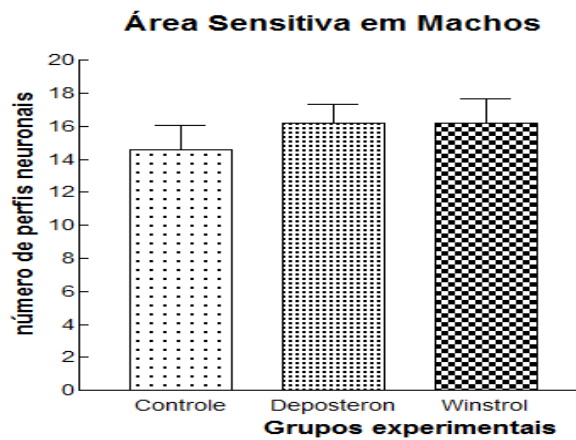
Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo Deposteron®;

** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Deposteron® em relação ao grupo Winstrol®.

Fonte: do autor.

De acordo com o Gráfico 18, abaixo, não foram encontradas diferenças significativas na densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios na área sensitiva dos animais machos, quando comparados controle aos dois grupos experimentais e também quando comparados os dois grupos experimentais entre si. O grupo controle apresentou uma média de 14,57 neurônios, enquanto o grupo tratado com Deposteron® apresentou uma média de 16,11 neurônios e o grupo tratado com Winstrol Depot® apresentou uma média de 16,15 neurônios.

Gráfico 18 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área sensitiva nos machos.



Fonte: do autor.

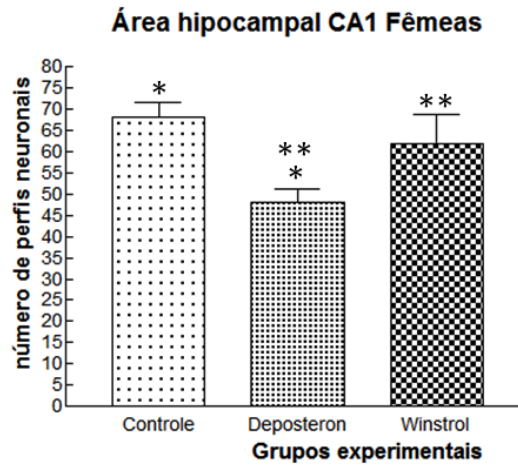
6.3.2 Áreas Hipocampais

As áreas hipocampais analisadas foram: CA1, CA2 e CA3.

6.3.2.1 CA1

A análise do Gráfico 19 mostra que houve diferença significativa na estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da Área hipocampal CA1 das fêmeas quando comparados o Grupo Controle com o grupo tratado com Deposteron®, mas não quando comparados o Grupo Controle e o Grupo tratado com Winstrol Depot®. A diferença também foi significativa quando comparados os grupos experimentais entre si. O Grupo controle apresentou uma média de 67 neurônios, enquanto o grupo tratado com Deposteron® apresentou uma média de 48,08 e o grupo tratado com Winstrol Depot® uma média de 61,78 neurônios.

Gráfico 19 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA1 nas fêmeas.

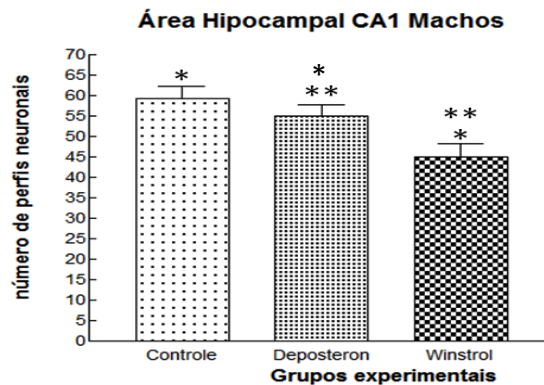


Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo Deposteron®; ** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Deposteron® em relação ao grupo Winstrol®.

Fonte: do autor.

A análise da área CA1 do hipocampo dos machos apresentou diferença significativa nas três comparações (controle x Deposteron; controle x Winstrol e Deposteron x Winstrol), com o grupo de machos tratados com Winstrol apresentando a maior redução da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios, de acordo com o Gráfico 20. O grupo controle obteve uma média de 59,25 neurônios, enquanto o grupo Deposteron® apresentou uma média de 55,05 e o grupo Winstrol Depot® uma média de 45,15 neurônios.

Gráfico 20: Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA1 nos machos.



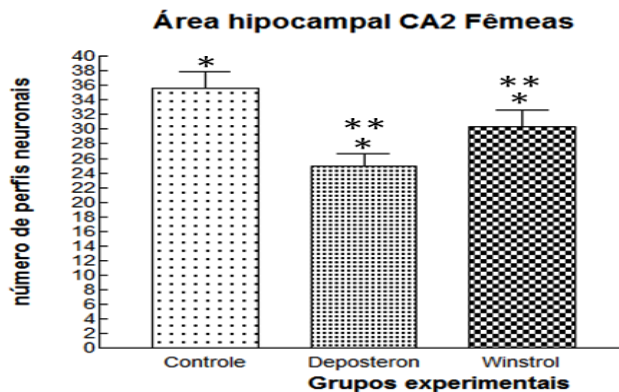
Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo Winstrol® e ao grupo Deposteron®; ** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Winstrol® em relação ao grupo Deposteron®.

Fonte: do autor.

6.3.2.2 Área Hipocampal CA2

A análise da área CA2 do hipocampo das fêmeas, representada no Gráfico 21, mostrou que houve diminuição na densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nos dois grupos experimentais (Deposteron® = 24,86 neurônios; Winstrol Depot® = 30,31 neurônios) quando comparados ao grupo controle (35,67 neurônios) e também quando comparados os grupos experimentais entre si, com o grupo tratado com Deposteron® sofrendo a maior redução. O grupo controle apresentou uma média de

Gráfico 21 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA2, nas fêmeas.

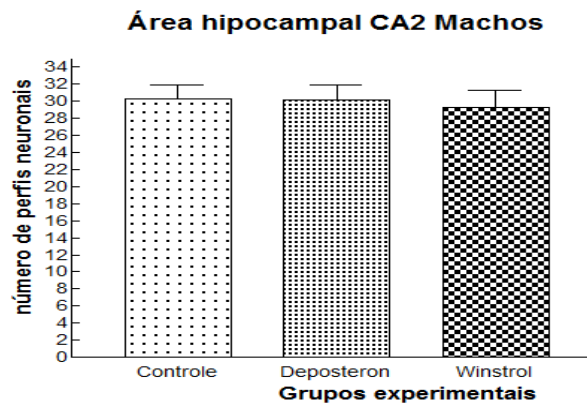


Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo Deposteron® e o grupo Winstrol®; ** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Deposteron® em relação ao grupo Winstrol®.

Fonte : do autor.

A análise dos grupos de animais machos não revelou diferença significativa na estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios na área CA2 do hipocampo, de acordo com o Gráfico 22. Enquanto o grupo controle apresentou uma média de 30,21 neurônios, o grupo Deposteron® apresentou uma média de 30,13 e o grupo Winstrol® uma média de 29,23 neurônios.

Gráfico 22 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA2 em machos.

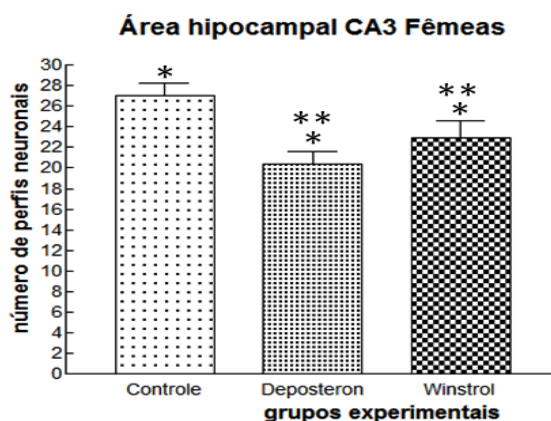


Fonte: do autor.

6.3.2.3 Área Hipocampal CA3

Semelhante à área hipocampal anterior (CA2), a análise estatística mostrou significância para as diferenças na estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nos grupos tratados com anabolizantes quando comparados ao grupo controle e também para a comparação entre eles, onde o grupo tratado com Deposteron® apresentou a maior redução, de acordo com o Gráfico 23. O grupo controle apresentou uma média de 27,01 neurônios, significativamente maior que a apresentada pelo grupo Deposteron®, 20,41, e que a apresentada pelo grupo winstrol®, 22,9 neurônios.

Gráfico 23: Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA3 nas fêmeas.

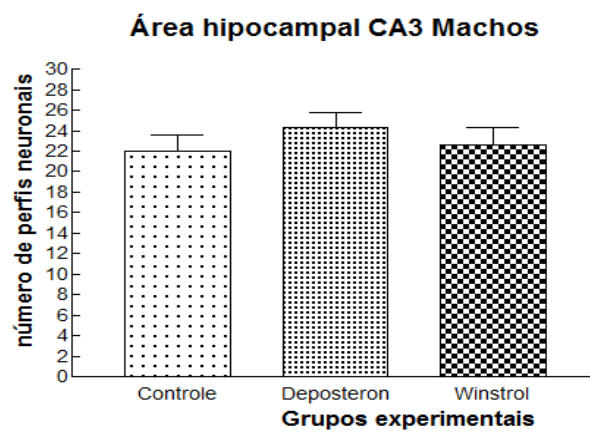


Sendo * = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo controle em relação ao grupo Deposteron® e o grupo Winstrol®; ** = Resultado significativo ($p < 0,05$) para o grupo Deposteron® em relação ao grupo Winstrol®.

Fonte: do autor.

Não foi encontrada diferença significativa entre a estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA3 entre os grupos de machos do experimento (Deposteron® = 24,28 neurônios; Winstrol® = 22,62 neurônios) quando comparados ao grupo controle (média de 22 neurônios), de acordo com o Gráfico 24.

Gráfico 24 - Estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios da área hipocampal CA3 nos Machos.



Fonte: do autor.

7 DISCUSSÃO

A discussão do trabalho foi feita a partir da comparação dos resultados do atual experimento com resultados encontrados na bibliografia.

7.1 PESO CORPÓREO

Os resultados sobre o assunto na literatura são controversos. Existem registros de ganho de peso corpóreo após o tratamento com esteroides, como no estudo de Meireles (2006), diminuição do peso corpóreo após o tratamento, como observado por Bauman (1988) e também a não alteração do peso corpóreo após tratamento, como visto no trabalho de Marinho (2006). Além das controvérsias encontradas, observa-se uma escassez de estudos sobre os anabolizantes utilizados no presente estudos, o Deposteron® (Cipionato de Testosterona) e o Winstrol Depot® (Stanozolol). Na bibliografia encontrada, os tratamentos foram realizados com Decanoato de Nandrolona, vendido comercialmente com o nome de Deca-Durabolin®, um dos anabolizantes mais consumidos ao redor do mundo (BAHRKE; YESALIS; BROWER, 1998; IRIART; ANDRADE, 2002; EVANS, 2004).

O American College of Sports Medicine (ACSM) revelou que o aumento de peso corporal ocorre, em alguns casos, quando associado a uma dieta adequada (rica em proteínas), e de um bom programa de treinamento. A literatura mostra, ainda, que o uso de altas doses de esteroides pode afetar negativamente o ganho de peso (MAX; RANCE, 1984; BAUMAN; RICHERSON; BRITT, 1988).

Os resultados observados no presente estudo condizem com os apresentados por Saborido et al. (1993), Marinho (2006) e Robert-Pires et al. (2013). Esperava-se um maior ganho de peso corporal dos animais tratados com esteroides anabólicos androgênicos (EAA), devido principalmente à retenção hídrica provocada pelos mesmos (WILSON; GRIFFIN, 1985; LICHTENBELT, 2004). A maior parte dos estudos com animais com a função testicular normal demonstrou pouco ou nenhum aumento do peso corporal após o uso de esteroides (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 1987; SABORIDO et al., 1993).

7.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise comportamental, feita através dos testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Memória e Reconhecimento de Objetos e Campo Aberto, gerou resultados que foram discutidos adiante.

7.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os resultados observados no grupo de fêmeas tratadas com Deposteron® e também no grupo de machos tratados com Winstrol Depot®, referentes ao aumento nos níveis de ansiedade, devido a uma diminuição no tempo de exploração e no número de entrada nos braços abertos, são confirmados pelo fato de não haver diminuição na atividade locomotora dos animais, o que indica que a diminuição nos parâmetros relacionados ao braço aberto do aparato estão relacionados diretamente à ansiedade assim como observado por Salvador et al. (1999), que não perceberam alterações na atividade locomotora de camundongos tratados com decanoato de nandrolona e propionato de testosterona, ou com uma mistura dos dois. Este estudo utilizou três metodologias diferentes, as quais foram denominados experimentos 1, 2 e 3, onde alterações na capacidade locomotora dos animais não foram encontradas em nenhum dos experimentos. Outro ponto importante a ser ressaltado foi o fato de não existir diferenças significativas nos parâmetros relacionados à ansiedade nos grupos controles indicando que o estresse causado pela repetida aplicação de injeções não foi o principal agente ansiolítico nos casos onde se observou alterações.

Os resultados obtidos neste experimento se mostram também de acordo com os resultados de Costine et al. (2010), onde os mesmos encontraram o efeito ansiogênico de três tipos de anabolizantes, dentre eles o Cipionato de testosterona, princípio ativo do Deposteron®. Barreto-Estrada et al. (2004) obtiveram como resultado do tratamento com anabolizantes um nível elevado de ansiedade nos ratos machos tratados, enquanto as fêmeas tratadas não apresentaram diferença no nível de ansiedade no LCE.

Resultados de acordo também com os obtidos por Ambar (2008), cujos animais machos tratados com esteroides (decanoato de nandrolona) diariamente, durante 28 dias também apresentaram um aumento nos níveis de ansiedade, observado na diminuição da permanência desses animais nos braços abertos do aparato e na área central do mesmo,

sendo ambas consideradas como áreas aversivas ao animal. Condizentes também com os resultados obtidos por Rocha (2006), onde foi constatado que o decanoato de nandrolona, aplicado duas vezes na semana (segunda e quinta-feira) em ratos machos, induziu aumento no nível de ansiedade. Tais resultados obtidos por Rocha (2006) derivam da diminuição do tempo de permanência e da taxa de entrada dos animais machos tratados com decanoato de nandrolona nos braços abertos do aparato (LCE).

Existem na literatura relatos sobre a controvérsia dos efeitos dos anabolizantes em modelos animais. De acordo com Bitran et al. (1993) e Clark e Henderson (2003) os poucos estudos sobre EAA e ansiedade apresentam resultados controversos, visto que estes tratamentos apresentaram tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos. 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.

A análise da ansiedade em modelos animais se mostrou controversa em relatos anteriores, uma vez que outros estudos que avaliaram o efeito dos EAAs na ansiedade obtiveram resultados inconsistentes, como nos estudos de Bitran et al. (1993), Barreto-Estrada et al. (2004) e Kouvelas et al. (2008), que encontraram um efeito ansiolítico dos anabolizantes, contrastando com os resultados obtidos no presente estudo e também com os obtidos por Minkin et al. (1993), Rocha (2006) e Ambar (2009).

Além destes, outros estudos, como o de Rojas-Ortiz et al. (2006), não apresentaram alterações relacionados à ansiedade nos animais tratados com EAAs. Essa contradição observada ao se comparar diferentes trabalhos pode ser causada devido a fatores como a diferença nas espécies utilizadas, no sexo e na idade dos animais, além das diferentes doses e regimes de aplicação (incluindo aqui a forma na qual a droga foi administrada).

7.2.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos

Silva et al. (2013) observaram os efeitos do propionato de testosterona sobre a memória de ratos. Utilizaram um tratamento agudo, consistindo em uma única aplicação seguida dos testes de memória, e outro crônico, onde os animais foram tratados

diariamente por 40 dias. Os ratos tratados cronicamente com o propionato de testosterona apresentaram diminuição no tempo de exploração do objeto novo (fase de experimento), quando comparados aos animais controle. Já os animais tratados com uma única dose do anabolizante não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Os animais tratados no atual experimento, tanto com Deposteron® quanto Winstrol Depot®, apresentaram diminuição nos tempos de exploração de ambos os objetos, incluindo o objeto novo na fase de experimento. Em ambos os casos, não foi constatada alteração na capacidade de retenção de memória dos animais submetidos ao tratamento com anabolizantes.

Outro experimento, publicado por Frye et al. (2008) verificou que o tratamento de ratos e camundongos com metabólitos da testosterona, dentre eles a androsterona, levou a um aumento na performance desses animais no teste de reconhecimento de objetos, além de reduzir a ansiedade destes. O terceiro grupo experimental deste trabalho, composto por ratos modificados geneticamente, sem os receptores de estrogênio (β ERKO mice), não apresentou os mesmos resultados que os outros, sendo que esses animais não demonstram melhoras no teste de reconhecimento de objetos e nem diminuição de parâmetros relacionados à ansiedade. Frye et al. (2008) partiram do pressuposto de que os vários metabólitos da testosterona têm diferente afinidade pelos receptores androgênicos, estrogênicos e Gaba-diazepínicos. Com seus resultados, concluíram que a ação ansiolítica e a melhora nas capacidades cognitivas observadas dependem da ação nos receptores $Er\beta$ (estrogênicos).

Kalinine et al. (2011), observaram que o tratamento com anabolizantes não alterou a capacidade de retenção de memória dos animais, prejuízos na memória foram observados apenas em animais tratados por um período maior, resultantes de uma exposição crônica à droga.

7.2.3 Campo Aberto: Atividade Motora Espontânea

Os resultados obtidos neste experimento mostram que não houve alterações na atividade locomotora espontânea desses animais, o que está de acordo com alguns experimentos que também não encontram mudanças na locomoção espontânea dos

animais tratados com EAAs, tanto em ratos (BING et al., 1998) quanto em camundongos (MARTINEZ-SANCHIS et al., 2002; KALININE et al., 2011).

O experimento de Martinez-Sanchis et al. (2002) foi realizado com camundongos Swiss machos. Ao tratar os animais com combinações de anabolizantes e cocaína, descobriram que os animais tratados apenas com anabolizantes não apresentaram alterações na atividade motora espontânea, enquanto os tratados com cocaína tiveram um aumento na atividade locomotora dose-dependente. Quando tratados com ambas as substâncias, observaram que o anabolizante aumenta a hiperatividade induzida pela cocaína.

Enquanto que o estudo realizado por Kalenine et al. (2011), envolvendo camundongos em tratamento crônico e subcrônico com decanoato de nandrolona, com o objetivo que analisar os parâmetros relacionados à atividade locomotora dos animais, analisados no teste do Campo Aberto, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e os grupos controles. No tratamento subcrônico nenhum dos parâmetros sofreu alteração, enquanto no tratamento crônico os parâmetros relacionados à locomoção não se alteraram, apenas alguns relacionados à ansiedade.

Bing et al. (1998) não encontraram alterações na atividade locomotora dos ratos machos Wistar, tanto no grupo tratado pela aplicação de cápsulas subcutâneas de cristais de testosterona quanto no grupo que receberam aplicação de anabolizantes. Salvador et al. (1999) não observaram alterações nos parâmetros relacionados à atividade locomotora espontânea de animais tratados com decanoato de nandrolona ou dos tratados com stanozolol (composto ativo do Winstrol Depot®).

Não foram observadas alterações relacionadas aos parâmetros de ansiedade, as quais, segundo Rocha (2008) e Ambar et al. (2009), estão relacionadas à maior permanência ou exploração dos animais nos quadrantes externos do aparato, uma vez que a proximidade com a parede demonstra maior segurança ao animal. Assim, animais com níveis elevados de ansiedade despenderiam mais tempo nessa parte do aparato, o que não foi observado quando comparados os grupos tratados com EAAs com os grupos controle. Resultados contradizem, neste ponto, com os obtidos por autores que encontraram padrões relacionados à ansiedade neste teste (Ambar et al., 2009; Kalinine et al., 2011).

Ramos (2008) cita em seu trabalho a importância da realização de outros testes comportamentais, como a caixa claro-escuro e o labirinto em cruz elevado para avaliar os parâmetros relacionados à ansiedade. No presente experimento, o LCE demonstrou parâmetros relacionados à elevação da ansiedade em alguns grupos tratados com EAAs enquanto não foram observadas alterações no teste do Campo Aberto. O estudo feito por Kalinine et al. (2011) com doses subcrônicas e crônicas de EAAs, obteve resultados relacionados à ansiedade no campo aberto dos animais tratados cronicamente mas não no LCE.

7.3 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DOS PERFIS DE CORPOS CELULARES DE NEURÔNIOS

Resultados semelhantes foram observados por Damião et al. (2012), cujo experimento revelou alterações significativas na quantidade de corpos de neurônios do córtex de animais tratados com anabolizantes. Os grupos tratados com o anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) e com o produto veterinário Potenay®, substâncias entre as mais utilizadas nas academias do Brasil (dados do CEBRID), apresentaram uma redução significativa no número de corpos celulares de neurônios do córtex cerebral, quando comparados aos animais do grupo controle, tratados com solução fisiológica. Com metodologia semelhante, Silva et al. (2012) não encontrou diferenças na estimativa do número de corpos celulares de neurônios no córtex cerebelar de animais tratados com anabolizantes quando comparados aos animais tratados com solução fisiológica.

Em seu estudo com culturas de células corticais de ratos, Orlando et al. (2007) analisaram o efeito da testosterona e de três de seus derivados sintéticos (nandrolona, stanozolol e gestrinone) na morte neuronal excitotóxica induzida por NMDA (N-methyl-D-aspartate). Em um de seus testes, observaram que a testosterona quando aplicada nas culturas quatro dias antes do pulso de NMDA, aumentava o potencial neurotóxico somente quando em concentrações muito elevadas (10 μ M), era protetora na concentração de 10 nM e inativa nas condições intermediárias. Na presença de inibidores da aromastase, a testosterona se tornou tóxica em baixas concentrações,

indicando que seu potencial tóxico é contrabalanceado por sua aromatização em 17 β -estradiol.

Ao contrário da testosterona, seus derivados sintéticos ampliaram a toxicidade do NMDA em baixas concentrações, sendo ainda insensíveis à ação dos inibidores da aromastase. Nenhum dos anabolizantes se mostrou tóxico sem a presença de NMDA. Assim, os resultados observados mostraram o potencial poder de amplificar a morte neuronal exotóxica dos EAAs, mecanismo que ocorre através da ativação de receptores de androgênios.

De acordo com Yang et al. (2005), pessoas que abusam de anabolizantes apresentam concentrações micro molares destas substâncias em seus cérebros, o que torna os resultados apresentados por Orlando et al. (2007) ainda mais preocupantes frente ao grande abuso dessas drogas na atualidade. Orlando et al. (2007) também citam que o stanozolol não serve de substrato para enzima aromastase, o que pode, mesmo necessitando de futuros estudos, nos ajudar a compreender o efeito do anabolizante Winstrol Depot® no atual experimento, o qual foi significativo na redução da densidade de corpos de neurônios na área cortical límbica dos machos.

De acordo com Martini (1982) e Kochakian (1993), o Cipionato de testosterona tem alta afinidade pelos receptores androgênicos, o que facilita a sua conversão pela enzima aromastase. A partir disso e com base nos resultados obtidos no atual experimento, onde o anabolizante Deposteron® foi efetivo na redução da densidade de corpos celulares de neurônios nas áreas corticais observadas nas fêmeas do grupo tratado e também na área límbica dos machos tratados, supõe-se que o efeito que contrabalanceia seu potencial neurotóxico, a conversão em 17 β -estradiol, não foi suficiente para proteger os neurônios.

Em relação às áreas hipocâmpais estudadas, Zhou et al. (2007) mostrou que regiões hipocâmpais têm seus neurônios protegidos pela aromastase, em casos associados à epilepsia. Novamente, pode-se supor que o possível efeito tóxico observado na estimativa da densidade dos corpos celulares de neurônios no tratamento com Winstrol Depot ® (Stanozolol), efetivo na redução da estimativa nas áreas hipocâmpais CA2 e CA3 das fêmeas tratadas e também na área CA1 dos machos. Para o anabolizante Deposteron®, que também se apresentou tóxico nas áreas hipocâmpais citadas das fêmeas e dos machos, mas é um composto propenso a sofrer aromatização, o

mecanismo que contrabalança a toxicidade observado por Orlando et al. (2007) não se encaixa.

Tucci et al. (2012) analisaram o efeito do tratamento com stanozolol no sistema monoaminérgico em diversas áreas cerebrais de ratos Wistar, entre elas o córtex pré-frontal e o hipocampo. Após o tratamento, os níveis de dopamina estavam elevados no hipocampo e diminuídos no córtex pré-frontal. Os níveis de serotonina e seus metabólitos estavam reduzidos em todas as áreas analisadas. A conclusão dos autores é de que o tratamento com stanozolol podem causar alterações neuroquímicas possivelmente envolvidas na depressão e no estresse dos animais.

Outros estudos também citam alterações causadas pelo uso de EAAs nos sistemas serotoninérgicos e gabaérgicos (THIBLIN et al., 1999; HALLBERG et al., 2000; YANG, 2002). O uso crônico de EAA em camundongos se mostrou indutor de mudanças dependentes de dose, sexo e idade na expressão gênica do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores (CLARK et al., 2006).

Brann&Mahesh (1994) demonstraram haver interações sinérgicas entre o glutamato e os esteroides gonadais, interações estas que podem participar da coordenação de diversas funções hipotalâmicas e límbicas. Diano (1997) contribuiu para esta teoria da interação glutamato/esteroides ao descobrir receptores glutaminérgicos (AMPAgluR) e receptores de esteroides em áreas límbicas e hipotalâmicas de ratos.

Os estudos de Lucas e Newhouse (1957) mostraram que o L-Glu também funcionava como uma neurotoxina, destruindo a retina de camundongos. Descobriu-se mais tarde que uma alta concentração de L-Glu na fenda sináptica leva a uma super estimulação dos seus receptores, o que eleva a concentração de Ca²⁺ no terminal pós-sináptico acima do limiar necessário para ativar os mecanismos regulatórios, ativando os mecanismos intracelulares de excito toxicidade que podem resultar na morte neuronal (SATTLER; TYMIANSKI, 2000).

A partir dessas observações, sugere-se que a diminuição na estimativa da densidade de corpos celulares de neurônios observadas no atual experimento pode ser resultado da administração crônica dos EAAs, que resultaram em uma liberação excessiva de L-Glu, atingindo o potencial neurotóxico e levando à morte neuronal nas áreas corticais e hipocámpais das fêmeas e dos machos tratados.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no atual experimento, tanto em relação aos parâmetros comportamentais quanto à análise da estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios permitem concluir que:

- o tratamento com anabolizantes alterou parâmetros relacionados à ansiedade nos animais machos e fêmeas, sendo que o anabolizante Deposteron aumentou o tempo de permanência das fêmeas nos braços fechados do LCE, mas não foi efetivo nos demais parâmetros das fêmeas ou dos machos, enquanto o anabolizante Winstrol Depot foi eficiente na redução do tempo de permanência de ambos, machos e fêmeas, nos braços abertos do aparato.

- o tratamento com anabolizantes deixou os animais apáticos, resultado obtido na Análise de memória e reconhecimento de objetos. Porém, o tratamento não alterou a capacidade de retenção de memória de curto prazo dos animais.

- o tratamento com o anabolizante Deposteron® reduziu a estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios em todas as áreas analisadas para os animais fêmeas, tanto corticais (Límbica, Motora e Sensitiva) quanto hipocampais (CA1, CA2 e CA3), enquanto o tratamento com o anabolizante Winstrol Depot® reduziu a estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios nas regiões hipocampais CA2 e CA3.

- o tratamento com o anabolizante Deposteron® reduziu a estimativa da densidade dos perfis de corpos celulares na região cortical Límbica e na região hipocampal CA1 dos animais machos. O tratamento com o anabolizante Winstrol Depot® foi significativo na redução dos perfis de corpos celulares de neurônios nas mesmas regiões que o anabolizante Deposteron® (Límbica e CA1) nos animais machos tratados com este anabolizante.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **NeurosciLett**, v. 356, p. 191–194, 2004.

AGIS-BALBOA, R. C. et al. Enhanced fear responses in mice treated with anabolic androgenic steroids. **Neuroreport**, v. 20, n. 6, p. 617-621, 2009.

AIKEY, J. L.; NYBY, J. G.; ANMUTH, D. M. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). **HormBehav**, v. 42, n.4, p. 448-460, 2002.

ALARANTA, A. et al. Self-reported attitudes of elite athletes towards doping: differences between type of sport. **IntJof Sports Med**, v. 27, n. 10, p. 842-846, 2006.

ALMEIDA, F. E. Esteroides anabolizantes: benefícios ou malefícios? **Rev Bras FisiolExerc**, v. 9, n. 2, p. 130-133, 2010.

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.

AMES, J.; SOUZA, D. Counterfeiting of drugs in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 1, p. 154-159, 2012.

AQUINO NETO, F. R. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Ver BrasMed Esporte**, v. 7, n. 4, p. 138-148, 2001.

ASSIS, W. S. **Efeitos da natação associada ao uso de dois esteróides anabolizantes (stanozolol e decanoato de nandrolona) sobre as fibras musculares oxidativas e glicolíticas do músculo gastrocnêmio de ratos**. Rio Claro, 2002. 181 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2002.

ATKINSON, R. C.; SHIFFRIN, R. M. Human memory: a proposed system and its control processes. **The Psychology of Learning and Motivation Advances and Research and Theory**, Academic Press, New York, v.2, cap. 4, p. 89 - 110, 1986.

BADDELEY, A. Working-memory. **Science**. v.255, p. 556-559. 1992.

BADDELEY, A. Working memory. **Life Sci**. v.321, p. 167-173, 1998.

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E.; BROWER, K. J. Anabolic-androgenic steroid abuse and performance-enhancing drugs among adolescents. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 7, n. 4, p. 821-838, 1998.

BAILEY, D. J. et al. Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. **BehavNeurosci**, v. 113, p. 276-282. 1999.

BAMMAN, M. M. et al. Mechanical load increases muscle IGF-1 and androgen receptor mRNA concentrations in humans. **Am J Physiol**, v. 280, p. 383–390, 2001.

BARRETO-ESTRADA, J. L. et al. Modulation of affect after chronic exposure to the anabolic steroid 17 α -methyltestosterone in adult mice. **Behav. Neurosci**, v. 118, p. 1071-1079, 2004.

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, p. 5108–5117, 2001.

BAUMAN, D. H.; RICKERSON, J. T.; BRITT, A. L. A comparison of body and organ weights, physiologic parameters, and pathologic changes in target organs of rats given combinations of exercise, anabolic hormone, and protein supplementation. **American Journal of Sports Medicine**, v.4, p.397-402, 1988.

BHASIN, S.; STORER, T. W.; BERMAN, N. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **N Engl J Med.**, v. 335, p. 1-7, 1996.

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

BITRAN, D.; KELLOGG, C. K.; HILVERS, R. J. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA_A receptors in the rat. **HormBehav.**, v. 27, n. 4, p. 568-583, 1993.

BLUE, J. G.; LOMBARDO, J. A. Steroids and steroid like compounds. **Clin Sports Med.**, v. 18, n. 3, p. 667-689, 1989.

BONINI, L.; FERRARI, P. F. Evolution of mirror systems: a simple mechanism for complex cognitive functions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1225, n. 1, p. 166-175, 2011.

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.

BROWER, K. J. et al. Evidence for physical and psychological dependence on anabolic androgenic steroids in eight weight lifters. **Am J Psychiatry**, v. 147, p. 510-512, 1990.

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

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

CATLIN, D. H.; KAMMERER, R. C.; HATTON, C. K. Analytical chemistry at the games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles. **Clinical Chemistry**, v. 33, p. 319-327, 1987.

CATLIN, D. H.; MURRAY, T. H. Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic sport. **JAMA**, v.276, p. 231-237, 1996.

CLARK, A. S.; HERNDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **NeurosciBiobehav 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.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**, 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap.2, p. 37-45.

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, p. 220-224, 2000.

COPELAND, J.; PETERS, R.; DILLON, P. Anabolic-androgenic use disorders among a sample of Australian competitive and recreational users. **Drug Alcohol Depend.**, v. 60, p. 91-96, 2000.

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

COSTINE, B. A. et al. Chronic anabolic androgenic steroid exposure alters corticotropin releasing factor expression and anxiety-like behaviors in the female mouse. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 10, p. 1473-1485, 2010.

COWART, V. S. Ethical, as well as physiological, questions continue to arise over athletes' steroid abuse. **JAMA**, v. 261, p. 3362-3367, 1989.

CRUZ, A. P. M.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **PharmacolBiochemBehav**, v. 49, p. 171-176, 1994.

CUNHA, T. S. **Efeito do esteróide anabólico androgênico nandrolona sobre o metabolismo do glicogênio em ratos sedentários e treinados.** Piracicaba, 2004. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. 2004.

CURI, R.; ARAÚJO FILHO, J. P. D. **Fisiologia básica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

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

DAVID, K. Oberdes Testosteron, desKfistallisierteMannlicheHormonausSteerentestes. **Acta BrevNeerlandPhysiolPharmacol Microbiol.**, v. 5, p. 85-86, 1935.

DAWSON, R. T. Hormones and sport: drugs in sport – the role of the physician. **J. Endocrinol.**, v. 170, p. 55-61, 2001.

DELEON, K. R.; GRIMES, J. M.; MELLONI, R. H. Repeated Anabolic-Androgenic Steroid Treatment during Adolescence Increases Vasopressin V_{1A} Receptor Binding in Syrian Hamsters: Correlation with Offensive Aggression. **Hormones and behavior**, v. 42, n. 2, p. 182-191, 2002.

DESCHENES, M. et al. Endurance and resistance exercise induce muscle fiber type specific responses in androgen binding capacity. **JSterBiochemMol Biol.**, v. 50, p. 175–179, 1994.

DE ROSE, E. H.; NÓBREGA, A. C. L. Drogas lícitas e ilícitas. **Exercício**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1999; p. 395-405.

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.

DOTSON, J. L.; BROWN, R. T. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. **Pediatric Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 761-769, 2007.

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

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V. et al. Neurobiologyoftheemotions. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 35, n. 2, p. 55-65, 2008.

EVANS, N. A. Currentconcepts in anabolic-androgenicsteroids. **Am J Sport Med.**, v. 32, p. 534-538, 2004.

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

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

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

FREEMAN, E. R.; BLOOM, D. A.; MCGUIRE, E. J. A brief history of testosterone. **J Urol**, v. 165, n. 2, p. 371-373, 2001.

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

FRYE, C. A. et al. Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. **Hormones and behavior**, v. 54, n. 5, p. 726-734, 2008.

GEREZ, J. R.; FREI, F.; CAMARGO, I. C. C. Histological assessment of ovaries and uterus of rats submitted to nandrolonedecanoate treatment. **Contraception**, v. 72, p. 77-80, 2005.

GHAPHERY, N. A. Performance-enhancing drugs. **OrthopClin N Am**, v. 26, p. 433-442, 1995.

GOLDBERG, L. et al. Effects of a multidimensional anabolic steroid prevention intervention. **JAMA**, v. 276, n. 19, p. 1555-1562, 1996.

GRAEFF, F. G.; DEL-BEN, C. M. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1326-1335, 2008.

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

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

GREENBLATT, R. B.; CHADDHA, J. S.; TERAN, A. Z. Aphrodisiacs. In Iverson SD (ed.) *Psychopharmacology: Recent Advances and Future Prospects*. British Association for Psychopharmacology, monograph no. 6. pp 290±302 Oxford: Oxford University Press, 1985.

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

HANDELSMAN, D. J. Androgen action and pharmacologic uses. **Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 2001; p. 232-42.

HARDMAN, J. G.; GILMANN, A. G.; LINBIRD, L. E. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 1996, p. 112-114.

HATFIELD, F. C. Esteroides anabólicos. **Sprint**, v. 4, n. 6, p. 246-256, 1986.

HATTON, C. K.; CATLIN, D. H. Detection of androgenic anabolic steroids in urine. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 7, p. 655-668, 1987.

HERMANS, E. J.; RAMSEY, F.; VAN HONK, J. Exogenous testosterone enhances responsiveness to social threat in the neural circuitry of social aggression in humans. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 3, p. 263-270, 2008.

HOBERMAN, J. M.; YESALIS, C. E. The Story of synthetic testosterone. **SciAm**, v. 272: p. 76, 1995.

IRIART, J. A. B.; ANDRADE, T. M. Musculação, uso de esteróides anabolizantes e percepção de risco entre jovens fisiculturistas de um bairro popular de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1379-1387, 2002.

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

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

JIN, B., et al. Androgen or estrogen effects on human prostate. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 12, p. 4290-4295, 1996.

JOHANSEN, K. L.; MULLIGAN, K.; SCHAMBELAN, M. Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 281, p. 1275-1281, 1999.

JOHANSSON, P. et al. Anabolic androgenic steroids increase B-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain. **Neuroscience Research**, v. 27, p. 185-189, 1997.

KALININE, E. **Efeitos comportamentais, neuroquímicos e metabólicos do tratamento com decanoato de nandrolona em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Básicas da Saúde) Laboratório de Bioquímica, Universidade de São Paulo, 2011.

KANAYAMA, G. et al. Anabolic–androgenic steroid dependence: an emerging disorder. **Addiction**, v. 104, n. 2, p. 1966-1978, 2009.

KAPIT, W.; MACEY, R. I.; MEISAMI, E. **Fisiologia: um livro para colorir**. 2. ed. São Paulo: Roca; 2004. Cap. 4.

KENNEDY, M. C. Newer drugs used to enhance sporting performance. **Med J Aust**, v. 173, p. 314-317, 2000.

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

KOCHAKIAN, C. D. History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. **Wien MedWochenschr.**, v.143, p. 359–63, 1993.

KOURI, E. M.; POPE, H. G. J. R.; OLIVA, O. S. Changes in lipoprotein-lipid levels in normal men following administration of increasing doses of testosterone cypionate. **Clin J Sport Med**, v. 6, n. 3, p. 152-157,1996.

KOUVELAS, D. et al. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 7, p. 925-934, 2008.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 411-434, 2002.

KYSELOVICOVA, O.; ANTALA, B.; MICHALAK, K. O. Uso de esteroides anabolizantes em esportistas recreativos. **Fit Perf J.**, v. 7, n. 2, p. 65-68,2008.

LEWANOWITSCH, T.; IRVINE, R. J. Effects of testosterone propionate and nandrolone on body composition and lipoprotein concentrations in the rat. **Addiction Biology**, v.6, p. 55-61, 2001.

LICHTENBELT, W. D. V. M. et al. Bodybuilders' body composition: effect of nandrolonedecanoate. **Medicine Science in Sports andExercise**, v. 36, n. 3, p. 484-489, 2004.

LIMA, P. L.; CARDOSO, F. B. Alterações Fisiológicas e Efeitos Colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 9, p. 29 -32, 2011.

LISE, M. L. Z., et al. O abuso de esteroides anabólicos androgênicos em atletismo. **RevAssMed Brasil.**, v. 45, n. 4, p. 364-370, 1999.

LINDQUIST, A. S., et al. Anabolic androgenic steroids affects competitive behaviour, behavioural response to ethanol and brain serotonin levels. **Behav Brain Res.**, v. 133, p. 21-29, 2002.

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

LUCAS, D. R; NEWHOUSE, J. P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **ArchOphthalmol.**,v. 58, p. 193-201, 1957.

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

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

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

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

MARCONDES, F. K. et al. Estrouscycleinfluencethe response offemalerats in theelevatedplus-maze. **Physiol. Behav.**, v. 74, n. 4, p. 435-440. 2001.

MARINHO, R. B. et al. Alterações histológicas promovidas pelo uso de esteróides anabólicos androgênicos (decanoato de nandrolona) em ratos. **Scientia**, v. 7, n.2, p. 89-109, 2006.

MARQUES, M. A. S.; PEREIRA, H. M. G.; AQUINO NETO, F. R. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. **Rev Bras Med Esporte**, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2003.

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

MARTIN, N. M.; DAYYEH, M. K. A.; CHUNG, R. T. Anabolic steroid abuse causing recurrent hepatic adenomas and hemorrhage. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 28, p. 573-575, 2008.

MARTINEZ-SANCHIS, S. et al. Effects of chronic treatment with testosterone propionate on aggression and hormonal levels in intact male mice. **Psychoneuroendocrino**, v. 23, p. 275-293, 1998.

MARTÍNEZ-SANCHIS, S.; ARAGON, C. M.; SALVADOR, A. Cocaine-induced locomotor activity is enhanced by exogenous testosterone. **PhysiolBehav.**, v. 76, p. 605-609, 2002.

MATSUMOTO, A. M. Endocrinology diseases unique to men. In Benett JC. & Plum F eds. **Cecil Textbook of Medicine**, 20th ed. Philadelphia: Saunders Co. 1996. p. 1325-1341.

MAX, S. R.; RANCE, N. E. No effect of sex steroids on compensatory muscle hypertrophy. **JournalofAppliedPhysiology**, v. 56, n. 6, p. 1589-1593, 1984.

MEIRELLES, A. C. F. **Efeitos do carvedilol em alterações cardiovasculares Induzidas experimentalmente em coelhos (*Oryctolagusuniculus*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UFPR, Curitiba, p. 75, 2008.

MELCHERT, R. B.; WELDER, A. A. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 9, p. 1252-1262, 1995.

MIDDLEMAN, A. B. et al. High risk behaviors among high school students in Massachusetts who use anabolic steroids. **Pediatrics**, v. 96, p. 268-272, 1995.

MILES, J. W. The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. **J Bone Joint Surg.**, v. 74, p. 411-422, 1992.

MILLER, A. P. Anabolic steroids – a contemporary view. **S. Af. Med Journal**, v. 85, n. 12, p. 1303-1304, 1995.

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

MOTTRAM, D. R.; GEORGE, A. J. Anabolic steroids. Baillieres Best Pract. **Res. Clin. Endocrinol.Metab.**, v. 14, p. 55–69, 2000.

NIESCHLAG, E. The history of testosterone. **Endocrine**, v. 10, p. 22-25, 2005.

NORTON, K.; OLDS, T. Morphological evolution of athletes over the 20th century: causes and consequences. **Sports Med.**, v.31, n.11, p. 763-783, 2001.

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

PALATINI, P. et al. Cardiovascular effects of anabolic steroids in weight-trained subjects. **J ClinPharmacol**, v. 36, n. 12, p. 1132-1140, 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.

PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Med Sci Sports Exerc.**,v. 38, n. 4, p. 644-651, 2006.

PARSSINEN, M. et al. Increase premature mortality of competitive power lifters suspected to have used anabolic agents. **Int J Sports Med.**, v. 21, n. 3, p. 225-227, 2000.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. 1084 p.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p.149–167, 1985.

POPE, H. G.; KATZ, D. L. Psychiatric effects of exogenous anabolic-androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, p. 34-45, 2003.

PORCERELLI, J. H.; SANDLER, B. A. Narcissism and empathy in steroid users. **Am J Psychiatry**, v. 152, p. 1672-1674, 1995.

QUINCEY, R. V.; GRAY, C. H. The metabolism of [1,2-3H]17-alpha-methyltestosterone in human subjects. **J Endocrinol**, v. 37, n. 1, p. 37-55, 1967.

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

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 29, n. 10, p. 493-498, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 5, p. 220-223.

RICH, J. D. The infectious complications of anabolic-androgenic steroid injection. **ntJ Sports Med**, v. 20, p. 563, 1999.

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

ROBERT-PIRES, C. M. et al. Esteroides anabólicos androgênicos não induzem hipertrofia muscular em ratos jovens eugonadais submetidos a treinamento intervalado de alta intensidade em esteira rolante. **BrazilianJournalofBiomotricity**, v. 7, n. 2, p.100-108, 2013.

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

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

ROSELLI, C. E. The effect of anabolic-androgenic steroids on aromatase activity and androgen receptor binding in the rat preoptic area. **Brain Res.**, v. 792, p. 271-276, 1998.

ROSSE, R. D.; DEUTSCH, L. H.; DEUTSCH, S. I. Diagnosis And Psychiatry: Examination Of The Psychiatric Patient. **Comprehensive Textbook Of Psychiatry**, 6. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p. 521-619.

RYAN, K. J. Biological aromatization of steroids. **J BiolChem**, v. 234, p. 268–272, 1959.

SABINO, C.; GOLDENBERG, M. **Anabolizantes: drogas de Apolo. Nu & vestido: dez antropólogos revelam a cultura do corpo carioca**. Rio de Janeiro: Record, 2002, p. 139-188.

SABINO, C.; LUZ, M. T. Ritos da Forma: A construção da identidade fisiculturista em academias de musculação na cidade do Rio de Janeiro. **Arquivos em Movimento**, v. 3, p 1-5, 2007.

SABORIDO, A.; MOLANO, F.; MEGÍAS, A. Effect of training and anabolic-androgenic steroids on drug metabolism in rat liver. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 25, n. 7, p. 815, 1993.

SADER, M. A. et al. Androgenic anabolic steroids and arterial structure function in male body builders. **J Am CollCardiol.**, v. 37, n. 1, p. 224-230, 2001.

SALVADOR, A.; MOYA-ALBIOL, L.; MARTINEZ-SANCHIS, S. Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice. **Percept Mot Skills**, v. 88, n. 1, p. 319-328, 1999.

SANTOS, A. M. **Mundo Anabólico**. Editora Manole Ltda, 2007.

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

SCHAFE, G. E.; NADER, K.; BLAIR, H. T. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 540-546, 2001.

SETEM, J.; SILVEIRA, R.; MORATO, S. Efeitos comportamentais e bioquímicos da restrição de água sobre o comportamento exploratório de ratos no Labirinto em Cruz

Elevado, XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Anais, 187, 2000.

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

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

SILVA, L. S. M. F.; MORAES, R. L. Uso de esteróides androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **RevBrasCiênc Farm.**, v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.

SILVA, P. R. P. et al. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2007.

SIMÕES, R. **Fundamentos fisiológicos para o treinamento de força e potência**. São Paulo: Phorte, 2003. 120 p.

SMITH, E. L. et al. **Bioquímica: mamíferos**. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

SMITH, S. T.; STACKMAN, R. W.; CLARK, A. S. Spatial working memory is preserved in rats treated with anabolic-androgenic steroids. **Brain Res**, v. 737, p. 313-316, 1996.

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

STACKMAN, R. W. et al. Stability of spatial working memory across the estrous cycle of Long-Evans rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 67, n. 2, p. 167-171, 1997.

STILGER, V. G.; YESALIS, C. E. Anabolic-androgenic steroid use among high school football players. **J Community Health**, v. 24, n. 2, p. 131-145, 1999.

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

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

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. **J Endocr.**,v. 51, n. 4, p. 425-434, 2004.

THEIN, L. A.; THEIN, J. M.; LANDRY, G. L. Ergogenic aids. **PhysTher.**, v. 75, p. 426-438, 1995.

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

TODD, T. Anabolic steroids: The gremlins of sport. **J. of Sport History**, v. 14, n.1, p. 87-107, 1987.

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

TUCKER, R. Abuse of anabolic-androgenic steroids by athletes and body builders: a review. **Pharmaceutical Journal**, v. 259, p. 171-179, 1997.

VAN BREDA, E. et al. Androgenic anabolic steroid use and severe hypothalamic-pituitary dysfunction: a case study. **International Journal of Sports Medicine**, v.24, p.195-6, 2003.

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.

VENTULANI, J. Drug addiction. Part 1. Psychoactive substances in the past and presence. **Pol J Pharmacol.**, v. 53, p. 201-214, 2001.

WALKER, J.; ADAMS, B. Cutaneous manifestations of anabolic–androgenic steroid use in athletes. **Int J Dermatol.**, v. 48, n. 10, p. 1044-1048, 2009.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

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

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

WILSON, J. D. Androgen abuse by athletes. **Endocrine Rev.**, v. 9, p. 181-199, 1988.

WILSON, J. D.; GRIFFIN, J. E. Disorders of the testes and male reproductive tract. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: WB Saunders Co, 1985, p.259.

WILSON, J. D. et al. **Androgens textbook of Endocrinology**. 9. ed. Baltimore: W. B. Sanders Company; 1999.

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

ZHOU, L. et al. Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA_A receptors. **Experimental neurology**, v. 203, n. 1, p. 72-81, 2007.

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

ANEXO



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 agosto de 2012.

Prof. Alessandra Esteves

Prezada Professora,

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

Por ser verdade, firmo o presente.

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

