



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

VALÉRIO LANDIM DE ALMEIDA

**EFEITOS QUANTITATIVOS DE DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE
ESTEROIDES ANABOLIZANTES EM NÚCLEOS DO HIPOTÁLAMO E
NO CORPO AMIGDALOIDE DE CAMUNDONGOS**

**QUANTITATIVE EFFECTS OF SUPRAPHYSIOLOGICAL DOSES OF
ANABOLIC-ANDROGENIC STEROIDS IN THE HYPOTHALAMIC
NUCLEI AND IN THE AMYGDALA OF MICE**

PIRACICABA

2017

VALÉRIO LANDIM DE ALMEIDA

**EFEITOS QUANTITATIVOS DE DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE
ESTEROIDES ANABOLIZANTES EM NÚCLEOS DO HIPOTÁLAMO E
NO CORPO AMIGDALOIDE DE CAMUNDONGOS**

**QUANTITATIVE EFFECTS OF SUPRAPHYSIOLOGICAL DOSES OF
ANABOLIC-ANDROGENIC STEROIDS IN THE HYPOTHALAMIC
NUCLEI AND IN THE AMYGDALA OF MICE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, na Área de Anatomia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor in Buco-Dental Biology, in Anatomy Area.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Bérzin

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
VALÉRIO LANDIM DE ALMEIDA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. FAUSTO BÉRZIN.

PIRACICABA

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

AL64e Almeida, Valério Landim de, 1979-
Efeitos quantitativos de doses suprafisiológicas de esteroides anabolizantes em núcleos do hipotálamo e do corpo amigdalóide de camundongos / Valério Landim de Almeida. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Fausto Bérzin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Esteroides. 2. Núcleo hipotalâmico paraventricular. 3. Núcleo arqueado do hipotálamo. 4. Núcleo central da amígdala. 5. Complexo nuclear basolateral da amígdala. 6. Camundongos. I. Bérzin, Fausto, 1940-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Quantitative effects of supraphysiological doses of anabolic-androgenic steroids in the hypothalamic nuclei and in the amygdala of mice

Palavras-chave em inglês:

Steroids

Paraventricular hypothalamic nucleus

Arcuate nucleus of hypothalamus

Central amygdaloid nucleus

Basolateral nuclear complex

Mice

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Fausto Bérzin [Orientador]

Geraldo José Medeiros Fernandes

Flávia da Ré Guerra

Denismar Alves Nogueira

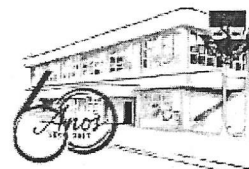
Fabiana Lucio de Oliveira

Data de defesa: 23-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2017, considerou o candidato VALÉRIO LANDIM DE ALMEIDA aprovado.

PROF. DR. FAUSTO BÉRZIN

PROF. DR. GERALDO JOSÉ MEDEIROS FERNANDES

PROF^a. DR^a. FLÁVIA DA RÉ GUERRA

PROF. DR. DENISMAR ALVES NOGUEIRA

PROF^a. DR^a. FABIANA LUCIO DE OLIVEIRA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida família: Ana Carolina – Carol (esposa), Paulinho (pai), Geny (mãe) e Ana Carolina (irmã). Todos sempre me incentivando e ensinando a viver com fé, responsabilidade e alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me favorecer com uma bela família, amigos de confiança e boa saúde para enfrentar as dificuldades diárias.

Aos animais que perderam suas vidas para a realização desse trabalho, pois são merecedores de todo respeito e consideração.

A meus pais e à minha irmã pelo carinho e por me mostrarem desde pequeno que nada é impossível quando se tem coragem, determinação e fé.

À minha querida esposa Ana Carolina (Carol) pelo amor incondicional, inspiração e por me auxiliar a suportar as durezas deste período: viagens, preocupações com os experimentos, prazos e muito trabalho nos feriados e em finais de semana.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques, por me proporcionar condições de continuar estudando para crescer profissionalmente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fausto Bérzin, pela confiança e por acreditar em minha capacidade na concretização deste trabalho. Agradeço especialmente pelos ensinamentos “extra-anatômicos” das aulas de campo e de muitas de nossas conversas durante as viagens a Alfenas. Aprendi muito com o Paizão da “Família Berzin”.

A todos da “Família Bérzin” pela união e companheirismo vividos ao longo desses anos de pós-graduação. Aos poucos partimos para novas conquistas, e seguirei feliz nessa jornada, principalmente por saber que nossa família continua em expansão. Um forte abraço ao Professor Fausto e à Dra. Graça em nome dos quais cumprimento nossos queridos irmãos de caminhada.

Ao casal amigo, professores Alessandra Esteves e Wagner Costa Rossi Junior, pela inestimável contribuição para a realização do trabalho, auxiliando sempre que preciso e permitindo o uso das instalações e equipamentos do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

Aos Professores Doutores Denismar Alves Nogueira, Flávia Da Ré Guerra e Ana Cláudia Rossi, que compuseram a banca de qualificação, pelas valiosas colaborações.

Aos Professores Doutores Geraldo José Medeiros Fernandes pelo auxílio com a versão para o inglês e Denismar Alves Nogueira com a parte de estatística.

A Suzete, secretária do Departamento de Morfologia da FOP, por me auxiliar sempre que precisei, através da qual estendo os agradecimentos a todo o setor.

Aos funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação pela cordialidade, atenção, disposição e eficiência na ajuda do que me foi necessário.

Aos professores e técnicos da Anatomia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares. Agradeço especialmente pelo companheirismo e compreensão dos professores Fabíola Alves dos Reis, Georje de Martin, e Kennedy Martinez de Oliveira que em muito me auxiliaram na parte administrativa e com a carga horária do conjunto das disciplinas de Anatomia da UFJF-GV durante o desenvolvimento desta tese.

Ao professor e colega Murilo Cesar do Nascimento por me receber em sua casa em Alfenas, nas minhas muitas idas para a realização do trabalho, e por ouvir minhas inquietações.

Ao amigo Henrique Zaccarelli pela amizade e por me receber em sua casa em Piracicaba sempre que precisei.

À Dona Cida, técnica de laboratório, fiel companheira do LEEM (Laboratório de Estereologia, Morfometria e Morfologia da UNIFAL-MG), agradeço as dicas, ponderações e principalmente a amizade, sempre com uma palavra de conforto quando algo parecia não dar certo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Olá, como vai?
Sou de Minas,
bem do interior,
de uma cidade pequena,
de pele morena,
de gente de paz.*

*Tenho o olhar comprido que passeia no horizonte
e a palavra minguada, que não vai muito distante,
mas é de fé certa e de força e de raça,
que não se desfaz com o vento nem se perde a desandar.”*

(...)

Trecho do poema “Viajante”, de Paulo Cesar de Almeida

RESUMO

Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs) são sintetizados a partir da testosterona. Embora existam trabalhos alertando sobre os efeitos deletérios desses fármacos, ainda são muito consumidos de forma abusiva entre os jovens que desejam uma aparência magra e musculosa ou na promoção do alívio da fadiga e melhora do desempenho físico. Devido à importância funcional do sistema nervoso central, o trabalho tem como objetivo geral estudar os efeitos quantitativos em neurônios de áreas específicas do cérebro (núcleos do hipotálamo e corpo amigdalóide) de camundongos que receberam doses supra fisiológicas de EAAs. A tese segue as normas do formato alternativo, com apresentação de 2 artigos: O primeiro artigo teve como objetivo avaliar quantitativamente os corpos celulares de neurônios nos Núcleos Paraventricular (PVN) e Arqueado (ARC) do hipotálamo de camundongos sob o uso de doses supra fisiológicas de EAAs. Foram utilizados 60 camundongos da linhagem Swiss divididos em 3 grupos (n=20, com 10 machos e 10 fêmeas): G1, com administração de Deposteron; G2, com administração de Winstrol; e G3, Controle, recebeu solução fisiológica. Os animais foram tratados por 30 dias com a administração dos fármacos e a prática de natação. Após esse período, foram eutanasiados, tiveram os encéfalos removidos e o material passou por processamento histológico e coloração. Para análise quantitativa de corpos celulares de neurônios empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples. Os resultados mostraram redução significativa no número de neurônios do ARC para os machos tratados com Deposteron® (p=0,0489) e Winstrol® (p=0,0004) em relação ao Controle. Não houve resultado significativo para o PVN de machos nem para o ARC e para o PVN das fêmeas. O segundo artigo teve como objetivo avaliar quantitativamente os corpos celulares de neurônios nos núcleos da Amígdala Central (AC) e Basolateral (BLA) do encéfalo de camundongos sob o uso isolado e combinado de EAAs. Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem Swiss divididos em 4 grupos (n=10): G1, Controle, recebeu solução fisiológica; G2, com administração de Deca Durabolin®; G3, com administração de Durateston®; e G4, com administração dos dois fármacos. Os animais foram tratados por 60 dias, recebendo os fármacos e praticando natação. Após esse período, foram eutanasiados, tiveram os encéfalos removidos e o material passou por processamento histológico e coloração. Para análise quantitativa de corpos celulares de neurônios empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples. Os resultados mostraram redução significativa no número de neurônios para todos os animais tratados com os EAAs em relação ao grupo Controle: Para a BLA a redução variou de 23% a 36% conforme o grupo; Para a AC,

a redução variou de 20% a 29% conforme o grupo. Conclui-se que a administração de doses suprafisiológicas desses EAAs provoca redução do número de corpos de neurônios da BLA e AC nos camundongos machos. A conclusão geral é de que a administração de doses suprafisiológicas de EAAs provoca redução do número de neurônios nos camundongos machos no núcleo arqueado do hipotálamo, e na amígdala basolateral e central.

Palavras-chave: Esteroides. Núcleo Hipotalâmico Paraventricular. Núcleo Arqueado do Hipotálamo. Núcleo Central da Amígdala. Complexo Nuclear Basolateral da Amígdala. Camundongos.

ABSTRACT

Anabolic-Androgenic Steroids (AAS) are synthesized from testosterone. Their irregular use began to grow among the population in the 1980s. Although there have been reported deleterious effects of these drugs, they are still largely consumed among young people that wish a lean and muscular appearance or in order to improve physical performance. There is also evidence of their neurodegenerative potential. Due to the functional importance of the Central Nervous System (CNS), this research aims to study the quantitative effects on neurons of specific brain areas (hypothalamic nuclei and amygdaloid body) of mice that received supraphysiological doses of AAS. This thesis follows the norms of alternative format, with presentation of 2 articles: the first one aimed the quantitative evaluation of the neuronal cell bodies in the Hypothalamic Paraventricular (PVN) and Arcuate (ARC) Nuclei of mice submitted to supraphysiological doses of AAS. A total of 60 Swiss lineage mice were divided into 3 groups ($n = 20$, 10 males and 10 females): G1, in which Deposteron® was administered; G2, in which Winstrol® was given; and G3, Control, which received saline solution. The animals were treated for 30 days with drug administration and swimming exercise. After this period, the mice were euthanized and their brains removed. The material underwent histological processing and staining. For quantitative analysis of neuron cell bodies, the simple random counting method was used. The results showed that there was a significant reduction in the number of ARC neurons for males treated with Deposteron® ($p = 0.0489$) and Winstrol® ($p = 0.0004$) in relation to control group, but there was no significant result for male PVN or for female ARC and PVN. The second article aimed to quantitatively evaluate the neuron cell bodies in central amygdala (CA) and basolateral (BLA) nucleus of mice under the isolated and combined use of AAS. A total of 40 Swiss lineage male mice were divided into 4 groups ($n = 10$): G1, Control, received saline solution; G2, in which Deca Durabolin® was administered; G3, in which Durateston® was administered; and G4, in which both drugs were given. The animals were treated for 60 days, receiving the drugs and practicing swimming. After this period, they were euthanized and had their brains removed. The material underwent histological processing and staining. For quantitative analysis of neuron cell bodies, the simple random counting method was used. The results showed that there was a significant reduction in the number of neuron cell bodies in all animals treated with AAS in relation to control group: for BLA the reduction varied from 23% to 36% according to the Group; for CA, the reduction varied from 20% to 29% according to the Group. The general conclusion is that administration of supraphysiological doses of AAS

causes reduction in the number of neurons in male mice at arcuate hypothalamic nuclei, basolateral and central amygdala.

Keywords: Steroids. Paraventricular Hypothalamic Nucleus. Arcuate Nucleus of Hypothalamus. Central Amygdaloid Nucleus. Basolateral Nuclear Complex. Mice.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGOS	20
2.1 Artigo: Analysis of Quantitative effects of supraphysiological doses of anabolic-androgenic steroids in the hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei of mice.	20
2.2 Artigo: Quantificação de corpos celulares de neurônios no núcleo central e no complexo nuclear basolateral do corpo amigdalóide de camundongos submetidos ao tratamento crônico com doses supra fisiológicas de esteróides androgênicos anabolizantes.	30
3 DISCUSSÃO	45
4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE 1 - Versão em português do item 2.1	55
ANEXOS	70
Anexo 1 – Confirmação da submissão do item 2.1 à publicação	70
Anexo 2 – Certificado do comitê de ética em pesquisa do item 2.1	71
Anexo 3 – Certificado do comitê de ética em pesquisa do item 2.2	72

1 INTRODUÇÃO

Esteroides Androgênicos Anabolizantes

Os Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs), também chamados de Esteroides Andrógenos Anabolizantes ou ainda Esteroides Andrógenos (ou Androgênicos) Anabólicos (Mooradian et al., 1987) representam uma classe de substâncias associadas ao sistema endócrino e relacionadas a hormônios masculinos.

O sistema endócrino regula respostas fisiológicas pela produção hormonal (Kersey et al., 2012; Rocha et al., 2014), capaz de aumentar ou diminuir as atividades celulares, induzir sua diferenciação e estimular mitoses (Rocha et al., 2014). Os hormônios classificam-se de acordo com critérios químicos em aminas, proteínas (ou peptídeos) e esteroides (Rocha et al., 2014). Esses últimos são produzidos no córtex das glândulas suprarrenais, nos testículos e nos ovários e por serem derivados do colesterol apresentam quatro anéis de carbono em sua estrutura química (Kersey et al., 2012; Rocha et al., 2014; Bond et al., 2016).

A testosterona, hormônio sexual masculino secretado nos testículos, é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características masculinizantes (androgênicas) e pela biossíntese tecidual nos tecidos somáticos (anabolismo), sendo um exemplo de Esteroide Androgênico Anabolizante (EAA) (Handelsman e Heather, 2008; Kersey et al., 2012; Rocha et al., 2014; Bond et al., 2016). Os EAAs são substâncias naturais ou sintéticas que apresentam propriedades anabólicas e androgênicas semelhantes à testosterona (Basaria et al., 2001; Dotson e Brown, 2007) e sua história tem raízes na endocrinologia antiga. Há milhares de anos os agricultores perceberam ser mais fácil domesticar animais castrados e a partir de então foram atribuídos poderes especiais de cura a testículos e pênis dos animais (Hoberman e Yesalis, 1995; Dotson e Brown, 2007). Baseados nessa crença, atletas da Grécia antiga desejosos de aumento do desempenho físico nos esportes, comumente usavam uma grande variedade de poções que incluíam plantas e extratos testiculares (Dotson e Brown, 2007; Pope et al., 2014).

As primeiras teorias e práticas do passado marcaram uma série de trabalhos que renderam experimentos famosos já no século XIX. Eugen Steinach, professor de fisiologia da Universidade de Viena, desenvolveu uma técnica de ligadura do ducto deferente na intenção de forçar uma hipertrofia das células de Leydig e elevar a produção de testosterona. Operou vários indivíduos, inclusive o criador da psicanálise, Sigmund Freud (Kahn, 2005; Dotson e Brown, 2007). Embora seus resultados fossem questionados, há relatos de casos em que

houve aumento do vigor físico, e até rejuvenescimento. Como estratégia para reposição hormonal o fisiologista, fundador da endocrinologia, Charles Édouard Brown-Séquard (Kersey et al., 2012) propunha a injeção de um extrato aquoso preparado a partir de testículos de animais. Após semanas de testes nele mesmo como cobaia, relatou aumento da força, concentração e energia. Estima-se que milhares de médicos e fisiologistas administraram doses de extratos similares na população da época (Basaria et al., 2001; Kahn, 2005; Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012). Baseados nos resultados desses trabalhos e no de Serge Voronoff (que implantou um testículo de primata no irmão mais velho, obtendo melhoras na condição física), uma série de cirurgias passou a realizar transplantes (ou implantes) de testículos de animais em homens e até em mulheres, com a promessa de melhorias no desempenho sexual, rejuvenescimento, maior vigor físico e mental (Kahn, 2005; Dotson e Brown, 2007).

Somente em meados da década de 30, a testosterona foi isolada em testículos de touro e, em 1935, desenvolvida sinteticamente a partir do colesterol (Basaria et al., 2001; Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012). Desde então seu uso clínico se estendeu cada vez mais no combate ao hipogonadismo, nas terapias de reposição hormonal e em casos de astenia, melancolia e doenças crônicas debilitantes (Basaria et al., 2001; Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Busardo et al., 2015). Infelizmente o uso não terapêutico também se expandiu: há suposições de que atletas alemães fizeram uso de EAAs na preparação para os jogos olímpicos de Berlim em 1936 e que tais substâncias também foram usadas por soldados combatentes a fim de aumentar sua agressividade e resistência (Pope et al., 2014).

A partir da década de 1940, seu uso tornou-se cada vez mais frequente no meio esportivo. Médicos da União Soviética admitiram que o time de levantamento de peso, campeão em 1952, fez uso de EAAs, o que estimulou os Estados Unidos a pesquisarem mais essas substâncias e a usá-las em seus atletas (Pope et al., 2014). Devido às reconhecidas propriedades anabólicas de favorecimento do desenvolvimento muscular, nos anos seguintes, o uso de EAAs chegou a outras modalidades esportivas, alcançando vários países (Dotson e Brown, 2007; Pope et al., 2014).

Na tentativa de minimizar os efeitos androgênicos e ampliar os anabólicos, a indústria farmacêutica constantemente desenvolve novos EAAs, mas, por apresentar um complexo mecanismo de ação, não é possível garantir a ausência de efeitos colaterais dessas substâncias nos indivíduos (Basaria et al., 2001; Kicman, 2008; Kersey et al., 2012). Doses supra-fisiológicas são comumente usadas e podem se relacionar com sintomas neurológicos, cardiovasculares, comprometimento hepático (Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014; Pomara

et al., 2015), ginecomastia e hipogonadismo (Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014). Nas mulheres também podem surgir efeitos virilizantes, hipertrofia de clitóris, hirsutismo, diminuição da mama (Kersey et al., 2012), redução da libido e alterações menstruais (Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014).

Essas razões levaram o Comitê Olímpico Internacional a banir o uso de EAAs em meados da década de 1970, e o controle de anabolizantes em larga escala começou a ser realizado a partir dos Jogos Olímpicos de Montreal em 1976 (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014). Essas substâncias passaram a ser rigorosamente controladas pelos órgãos federais de alguns países, inclusive o Brasil (Kicman, 2008). Entretanto os EAAs para fins não medicinais passaram a ser comercializados ilegalmente (Dotson e Brown, 2007; Kicman, 2008) e, a partir da década de 1980, (Kanayama et al., 2013) atingiu a população comum, frequentadora de academia, desejosa de obtenção do aumento de massa muscular e de um corpo esbelto e musculoso (Kersey et al., 2012; Busardo et al., 2015; Pomara et al., 2015).

Aproximadamente dois terços do consumo abusivo dos EAAs ocorrem entre usuários de centros de treinamentos, ginásios e academias, sendo caracterizado por doses que podem ser 10 a 100 vezes maiores que a terapêutica (Kahn, 2005; Kanayama et al., 2013; Pope et al., 2014). Geralmente é comum o uso concomitante de dois ou mais EAAs sob as formas injetável ou oral (Kanayama et al., 2009; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014) que, na maioria das vezes, são administrados pelo próprio indivíduo sem treinamento adequado, colocando a saúde em risco.

Hipotálamo

O hipotálamo é uma pequena área diencefálica, bilateral, localizada inferiormente no cérebro. Compreende menos de 1% do volume total do encéfalo e age diretamente no ambiente interno por seu controle sobre o sistema endócrino e sobre o sistema nervoso autônomo (Kandel, 2013; Netter et al., 2013). Possui uma complexa coleção de grupos celulares dispostos em núcleos e, para facilitar o estudo, divide-se o hipotálamo anteroposteriormente em regiões supraóptica, tuberal e mamilar, e mediolateralmente em zonas periventricular, medial (intermédia) e lateral (Standring e Gray, 2008; Netter et al., 2013; Liao et al., 2015).

Alguns núcleos do hipotálamo medial desempenham um papel essencial no controle das funções corporais (Pearson e Placzek, 2013), adequando as respostas fisiológicas às demandas ambientais. Seus circuitos são influenciados por sinais que carregam

informações sobre os estados nutricionais e metabólicos, assegurando a homeostasia (Bouret, 2013; Cornejo et al., 2016; Sutton et al., 2016). Os níveis séricos dos hormônios leptina, grelina e insulina variam na proporção das reservas de energia do corpo e da alimentação, sendo responsáveis por comunicar a disponibilidade de nutrientes ambientais a núcleos do hipotálamo que regulam o estado nutricional, influenciando a alimentação e o gasto energético (Cone, 2005; Williams e Elmquist, 2012; Bouret, 2013; Liao et al., 2015; Sutton et al., 2016; Yasrebi et al., 2016).

O Núcleo Arqueado do Hipotálamo (ARC), localizado bilateralmente próximo à região inferior do terceiro ventrículo, é um local predominante para a integração destes sinais periféricos transmitidos pela corrente sanguínea, sendo também influenciado pelos níveis séricos de glicose e esteroides sexuais (Cone, 2005; Williams e Elmquist, 2012; Bouret, 2013; Chitravanshi et al., 2015; Liao et al., 2015; Cornejo et al., 2016; Sutton et al., 2016).

No ARC existem neurônios que expressam a pro-opiomelanocortina (POMC, de função anorexígena), e que coexpressam o Neuropeptídeo Y (NPY, de função orexígena) e o Peptídeo Relacionado ao Agouti (AgRP, de função orexígena), desempenhando papéis importantes no gasto energético e na regulação da ingestão de alimentos (Cone, 2005; Williams e Elmquist, 2012; Bouret, 2013; Liao et al., 2015). A partir do ARC, essas populações neuronais se projetam a outras regiões hipotalâmicas, incluindo o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN), o Núcleo Dorsomedial e a Área Hipotalâmica Lateral (Bouret, 2013; Liao et al., 2015). Desses, é importante o circuito ARC-PVN na obtenção de respostas essenciais à homeostase, ao equilíbrio energético e às reações comportamentais (Parker e Bloom, 2012; Maejima et al., 2014; Manojlovic-Stojanoski et al., 2016; Sutton et al., 2016). Além dessas ações, O PVN exerce a função de um centro integrador do controle neuroendócrino e autonômico (Lozic et al., 2016) atuando em outras ações importantes como produção de leite, contração uterina e o controle do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal pela vasopressina e pelo hormônio liberador de corticotropina, o que envolve equilíbrio hídrico, controle cardiovascular (Chitravanshi et al., 2015; Lozic et al., 2016; Manojlovic-Stojanoski et al., 2016) e hormônios tireoidianos (Alkemade, 2015).

Assim, quando comprometidos, os Núcleos Arqueado e Paraventricular podem prejudicar funções vitais que integram respostas endócrinas e autonômicas essenciais à homeostase e ao equilíbrio energético (Cone, 2005; Ferguson et al., 2008; Bouret, 2013; Liao et al., 2013; Carmichael e Wainford, 2015; Chitravanshi et al., 2015; Lozic et al., 2016; Manojlovic-Stojanoski et al., 2016; Sutton et al., 2016).

Corpo Amigdalóide

O corpo amigdalóide (amigdalóide = semelhante à amêndoa) envolve um conjunto bilateral de núcleos (daí também ser conhecido como “complexo amigdalóide”), localizado na região anteromedial do lobo temporal, e pode ser organizado em três regiões: Amígdala Basolateral (BLA), Amígdala Central (AC) e um grupo celular esparso chamado de “massas de células intercaladas” (McDonald, 1998; Pape e Pare, 2010; Duvarci e Pare, 2014). Nos animais não primatas, sua localização é similar à descrita e possui organização semelhante em todos os mamíferos (McDonald, 1998).

Reconhecidamente envolvido no processamento emocional (Christian et al., 2013; Duvarci e Pare, 2014; Wassum e Izquierdo, 2015; Hernandez-Lallement et al., 2016), o corpo amigdalóide exerce controle sobre: ansiedade, memória (Christian et al., 2013; Silberman e Winder, 2013), medo (Pape e Pare, 2010; Christian et al., 2013; Duvarci e Pare, 2014; Wassum e Izquierdo, 2015) e agressividade (Adams e Moghaddam, 2000; Wommack e Delville, 2002; Pirnik e Kiss, 2005).

As principais fibras de projeção para a circuitaria emocional no corpo amigdalóide são compostas por aferências glutamatérgicas do tálamo e do córtex frontal que chegam, em sua maioria, aos neurônios dos núcleos da BLA. Essas células, também glutamatérgicas, impulsionam sinais responsáveis por manifestações fisiológicas e psicológicas, afetando profundamente as emoções conforme a regulação excitatória do glutamato resultante dessas conexões (Christian et al., 2013; Duvarci e Pare, 2014; Wassum e Izquierdo, 2015). Em seguida, a informação pode voltar às áreas de origem, bem como ser direcionada para outras regiões corticais, hipocampo, estriado, hipotálamo ou ainda realizar conexões com a AC (Wassum e Izquierdo, 2015). Os neurônios da AC contêm principalmente o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA) como neurotransmissor, embora existam subpopulações neuronais que apresentam o glutamato. A AC estabelece conexões eferentes com hipotálamo, tronco encefálico e outras estruturas do sistema nervoso central. Modulando as conexões nucleares dessas duas regiões do corpo amigdalóide se encontram as massas de células intercaladas que agem de forma inibitória (Duvarci e Pare, 2014).

O corpo amigdalóide também é responsável pela detecção, geração e manutenção das emoções relacionadas ao medo bem como coordenação de respostas apropriadas à ameaça e ao perigo (Phan et al., 2002; de Gelder et al., 2004; Hoistad e Barbas, 2008; Duvarci e Pare, 2014). Ele capta informações de todos os sistemas sensoriais e as projeta de forma específica aos núcleos amigdalianos, permitindo a integração das instruções provenientes das diversas

áreas cerebrais, inclusive com o hipotálamo por meio de conexões excitatórias e inibitórias (Williams et al., 2006).

Alterações no corpo amigdalóide são extremamente prejudiciais à socialização do indivíduo, relacionando-se a estados mentais de ansiedade, depressão (Phan et al., 2002; de Gelder et al., 2004; Hoistad e Barbas, 2008; Christian et al., 2013; Silberman e Winder, 2013; Duvarci e Pare, 2014; Wassum e Izquierdo, 2015; Hernandez-Lallement et al., 2016) e agressividade (Adams e Moghaddam, 2000; Wommack e Delville, 2002; Pirnik e Kiss, 2005).

Considerando a influência dos esteroides sexuais no sistema nervoso e as evidências do potencial neurodegenerativo dos esteroides androgênicos anabolizantes verificou-se a necessidade de estudar os efeitos dessas substâncias em regiões específicas do encéfalo.

A tese está apresentada em formato alternativo, conforme normas baseadas na elaboração e normalização de dissertações e teses da FOP/UNICAMP (2015), com apresentação de 2 artigos, que têm como objetivo geral avaliar os efeitos quantitativos em neurônios do hipotálamo (Núcleos Paraventricular e Arqueado) e do corpo amigdalóide (Amígdala Basolateral e Central) de camundongos que receberam doses suprafisiológicas de Esteroides Androgênicos Anabolizantes.

2 ARTIGOS

2.1 Analysis of Quantitative Effects of Supraphysiological Doses of Anabolic-Androgenic Steroids in the Hypothalamic Arcuate and Paraventricular Nuclei of Mice*

*Artigo submetido ao periódico CNS & Neurological Disorders - Drug Targets (Apêndice 1)

Valério Landim de Almeida^{1*}, Alessandra Esteves², Wagner Costa Rossi Junior², Bruno Damião² and Fausto Bérzin¹

¹*Department of Morphology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil*

²*Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil*



Abstract: Anabolic Androgenic Steroids (AAS) are synthesized from testosterone. Their irregular use began to grow among the population from the 1980s. Although there are reports of the deleterious effects of these drugs, they are still very consumed among young people who want a lean and muscular appearance or to promote improvement of physical performance. There is evidence of neurodegenerative potential of AAS. **Objective:** To evaluate quantitatively neuron cell bodies in the hypothalamic Paraventricular and Arcuate nuclei of mice submitted to supraphysiological doses of testosterone cypionate and stanozolol. **Methods:** A total of 60 Swiss mice were divided into 3 groups (n = 20, 10 males and 10 females): G1, in which testosterone cypionate was administered; G2, in which stanozolol was given; and G3, control, which received physiological saline solution. After 30 days of drug administration and swimming practice, mice were euthanized and their brains removed. The material underwent histological processing and staining. For quantitative analysis of neuron cell bodies a stereological method was used. **Results:** There was a significant reduction in the number of cells of the Arcuate nucleus in male mice treated with testosterone cypionate (p = 0.0489) and stanozolol (p = 0.0004) in relation to control group. There were no significant results for paraventricular nucleus in male mice or for arcuate and paraventricular nuclei in female mice. **Conclusion:** Administration of supraphysiological doses of AAS causes a reduction in the number of neuron cell bodies in male mice for hypothalamic arcuate nucleus.

Keywords: Steroids; Hypothalamic Arcuate Nucleus; Hypothalamic Paraventricular Nucleus; Hypothalamus; Stanozolol; Testosterone; Mice.

*Address correspondence to this author at the Department of Morphology, Faculty: Piracicaba Dental School; University: State University of Campinas. Address: Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba, São

Paulo, Brazil. zipcode: 13414-018. Tel/Fax: +55-19-2106-5200; E-mail:valerioalmeida@msn.com.

1. INTRODUCTION

1.1. Anabolic-Androgenic Steroids (AAS)

Hormones are compounds produced by endocrine glands that, as reaching the target organs, chemically regulate specific body functions that interfere in cellular activities. One of AAS hormones classifications is the group of steroids that has a chemical structure formed by four carbon rings. These hormones have cholesterol as a precursor and are produced by the gonads, adrenal cortex and active metabolites of vitamin D [1, 2].

Among sex hormones there is progesterone and estrogen, synthesized in the ovaries, and testosterone, in the testes. Testosterone is both androgenic and anabolic, being related to masculinizing characteristics and tissue development [2]. Thus, testosterone is an Androgenic-Anabolic Steroid (AAS) and its actions affect several tissues, beyond muscular and skeletal, including the reproductive, hepatic, renal, hematopoietic and nervous systems [1].

AAS group encompasses a family of lipophilic hormones derived from cholesterol that includes the male natural hormone, testosterone, along with its synthetic derivatives [3-5]. In Ancient Greece, Olympic athletes already used a variety of potions, plants and animal extracts to enhance performance in sports [6]. In the nineteenth century, there had been a series of experiments aiming rejuvenating, increasing strength and physical condition [1, 7, 8].

In 1935, testosterone was chemically isolated from bull testes and then synthetically developed from cholesterol [1, 8]. The clinical use of AAS has been spread since the 1940s in hormone replacement therapies, in the treatment of debilitating chronic diseases, anemias, burns, in some types of trauma, surgeries and in the therapy to control depression, melancholia and some types of cancer [1, 8, 9].

Although AAS are controlled substances in several countries, like USA and Brazil, non-medicinal AAS are largely and illegally marketed, including through the Internet and even in fitness centers [8]. They began to be acquired by ordinary people in the 1980s and have become widely used, especially among young people who wish a lean and muscular appearance or to relieve fatigue and improve physical performance, even during recreational activities among non-athletes [1, 4, 9, 10].

1.2. Hypothalamus: Arcuate and Paraventricular Nuclei

Hypothalamus is a small bilateral diencephalic area, close to the third ventricle, that has a wide collection of neuron cell groups arranged in nuclei [11]. Influenced by signals that carry information about nutritional and metabolic states, its circuits play an essential role in homeostasis, ensuring that physiological responses are in tune with environmental requirements [12]. The homeostatic regulation of energy balance depends on the activity of the neural circuits of the hypothalamus, especially those related to the Arcuate Nucleus (ARC) [13, 14], located bilaterally near the inferior region of the third ventricle [15-18].

The ARC responds to a variety of hormones and nutrients, including leptin, insulin, ghrelin, sex steroids and glucose [12, 14-16, 18, 19]. Its neuron cells project to other regions involved in feeding control, such as the hypothalamic dorsomedial nucleus, the lateral area and the Paraventricular Nucleus (PVN) [12, 16]. In order to meet the energetic demands of an animal, ARC projections for PVN are particularly relevant [14, 20-22].

Lesions in afferent PVN neuron cells from ARC reveal the importance of this nucleus, since they result in hyperphagic obesity, while the activation of these cells promotes increased energy expenditure and reduced food intake [14]. The PVN exerts the function of an integrating neuroendocrine and autonomic control center [23] acting on other important functions such as milk production, uterine contraction and hypothalamic-pituitary-adrenal axis controlled by vasopressin and corticotropin releasing hormone, which involves fluid balance, cardiovascular control [17, 23, 24], and thyroid hormones [25].

Observing the indiscriminate consumption of AAS and analyzing the physiological relevance of ARC and PVN in the integration of essential responses to homeostasis and energy balance, it is proper to study the effects of supraphysiological doses of two of these substances on mice neuron cells once there are structural similarities with the brain of the human being.

The aims of this study is quantitatively evaluate neuron cell bodies in the Hypothalamic Paraventricular (PVN) and Arcuate (ARC) Nuclei of mice submitted to the use of supraphysiological doses of Deposteron® (testosterone cypionate) and Winstrol Depot® (stanozolol) and to compare the data between male and female animals.

2. MATERIALS AND METHODS

Sixty Swiss lineage mice were used: 30 males and 30 females. The animals were 90 days old (young adults) and their body weight ranged from 40 to 50 grams. They were housed in boxes containing 5 animals each, treated with commercial mice chow, received water *ad libitum* and were kept in a 12-hour light-dark cycle.

3. EXPERIMENTAL

The pharmacological treatment consisted in intraperitoneal injections [26-28] of the following AAS: Deposteron® (testosterone cypionate), from EMS Sigma Pharma, and Winstrol Depot®

(stanozolol) from Landerlan Laboratory. The doses [29, 30] are displayed in Table 1. Steroids were administered twice weekly (Tuesdays and Thursdays), at the same time of the day, during 30 days. In control group, physiological saline solution was administered in the same volume as AAS in other groups [28] (Table 1).

Three times a week when the injections were not carried out (Mondays, Wednesdays and Fridays), the animals were submitted to swimming for 5 minutes in a plastic container measuring 43x34x26cm, containing water at 24-26°C temperature and at a height sufficient for the animals do not get out of the container or touch its bottom [28].

Table 1 - Groups of animals according to injected substance and dosage.

Groups	Animals		Injected substance	Dosage	Practice
	Male	Female			
Deposteron	10	10	Deposteron® (testosterone cypionate)	0,8mg/kg	Swimming
Winstrol Depot	10	10	Winstrol Depot® (stanozolol)	1,8mg/kg	Swimming
Control	10	10	Saline solution 0,9%	0,04 ml/injection	Swimming

The animals were euthanized by inhalation of isoflurane for subsequent craniotomy. The brains were removed *in totum*, washed in saline solution and fixed in glass containers containing 4% paraformaldehyde in phosphate buffer solution for 24 hours [31]. After this period, the standardized sequence of conventional histological process was followed: alcohol dehydration, xylol diaphonization and paraffin inclusion.

From each brain, serial and homotypic samples were taken by frontal cuts [32-34] with a thickness of 7µm in Yidi YD-315 microtome. To evaluate the areas settled for the study [35] the material was stained with cresyl violet [33, 36]. This technique allows the visualization of Nissl corpuscles on neuron cell bodies, which makes it possible to strongly and individually mark each cell for later counting in optical microscopy [34, 36, 37].

For quantitative analysis of neuron cell bodies, the simple random counting method was employed [38-40].

The determination of the studied areas matches with the representation of images 37 and 44 from Franklin and Paxinos' Stereotaxic atlas [35]: the Paraventricular Nucleus (PVN) was in a plane in

which it was possible to visualize the suprachiasmatic nucleus, and the Arcuate Nucleus (ARC) was in a plane in which it was possible to visualize the dorsomedial nucleus.

Each nucleus had two areas quantified per hemisphere, totalizing 4 areas per cut. To avoid counting the same neuron cell body more than once, three semi-serial cuts per animal were analyzed, totalizing 12 histological fields per studied nucleus for each animal. As two nuclei (PVN and ARC) were quantified, a sum of 24 areas per animal were taken. Thus, for all samples used, a total of 1440 areas was quantified at 400x magnification (Figure 1).

The counting was done with the aid of a test area (counting frame) measuring 120.75 cm². Neuron cell bodies that had nucleoli and were located within the test area and the inclusion line (green dashed) were counted. The neuron cell bodies that touched the continuous red lines were excluded [28, 32, 38] (Figure 2). All analyzes were performed on a computer with the *Axiovision 4 Image Interactive Measurement Imaging System* coupled to a Carl Zeiss® *AxioScope A1* microscope.

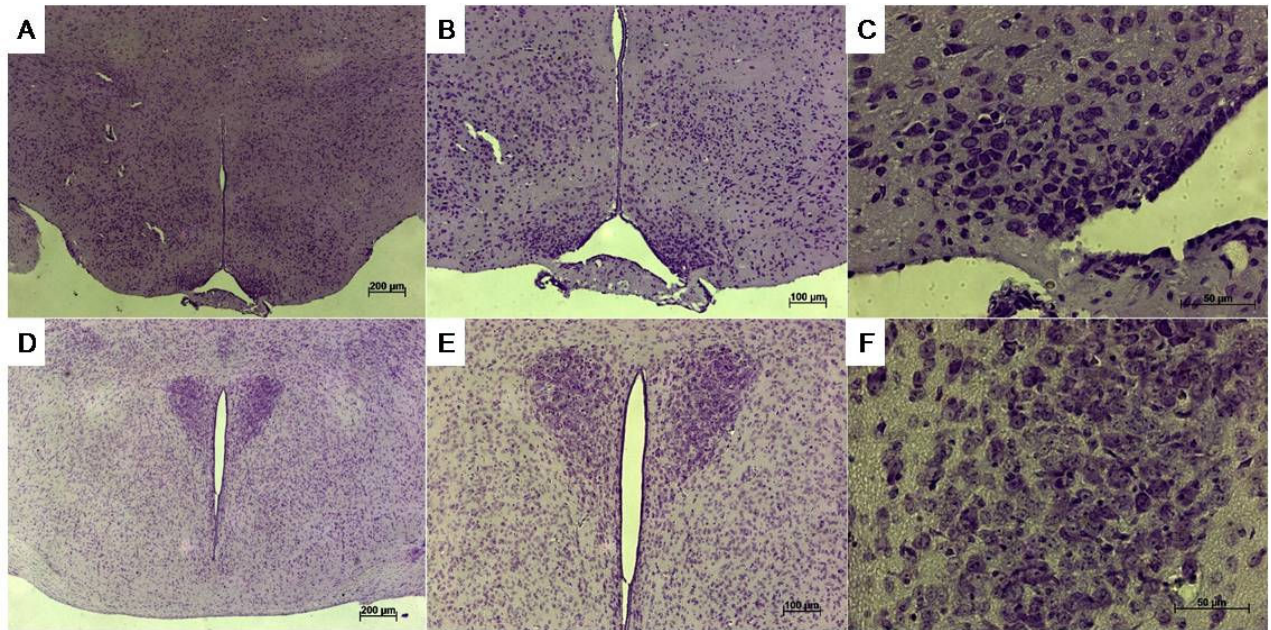


Figure 1 - Photomicrography in gradual increase of the frontal cuts of a mouse brain to illustrate the method used: the highest densities of neuron cell bodies of the upper part of the image (A-C) belong to the ARC; the highest densities of neuron cell bodies of the lower part of the image (D-F) belong to the PVN. The quantitative analysis was performed at 400x magnification, visible in C and F. Author's image.

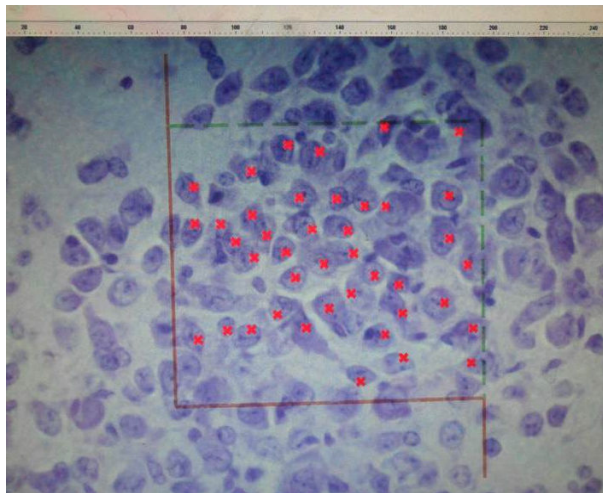


Figure 2 - The test area used (counting frame). Only neuron cell bodies inserted in the quadrant or within the green dashed line were counted, excluding those that touched the continuous red lines. Author's image.

Statistical analysis was performed using Analysis of Variance (ANOVA) with a completely randomized factorial scheme design followed by Tukey's multiple comparisons test. The statistical system R [41] was used with the

ExpDes.pt feature [42] and for all analyzes the significance level of 5% was adopted.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1 Comparison among male mice

Figure 3-A shows the comparison of neuronal quantification in the different groups among the nuclei evaluated in male animals (means and standard deviations). For control group, there was a significant difference ($p = 0.042$) between the means of neuron cell bodies when comparing ARC (41.49 ± 13.9) in relation to PVN (35.21 ± 9.89). Treatment with Deposteron® also led to a reduction in neuronal quantification ($p = 0.0489$) of ARC (25.81 ± 6.15) compared to PVN (31.76 ± 9.7). However, in the treatment with Winstrol Depot® no statistical difference was observed between the nuclei.

The male mice ARC neuronal analysis (Figure 3-B) shows a significant reduction of neuron cell bodies ($p = 0.0004$) when compares the control group (41.49 ± 13.9) with the animals treated with both Deposteron® (25.81 ± 6.15) and Winstrol Depot® (22.66 ± 6.9), being the treated groups statistically the same.

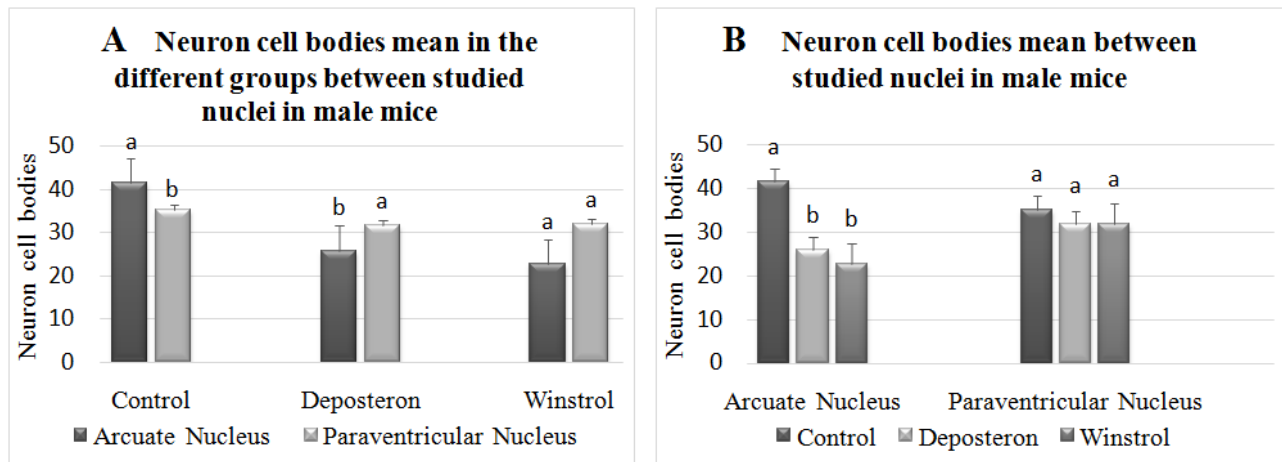


Figure 3 - Chart A: Comparison of the mean number of neuron cell bodies in the different groups between the studied nuclei in male mice and respective standard deviations. Chart B: Comparison of the mean number of neuron cell bodies of the nuclei in male mice among the groups and their respective standard deviations. Different letters represent significant differences at level of significance of 5% measured by Tukey test.

However, the mean number of male mice PVN neuron cell bodies does not present statistical difference when comparing with the other groups (Figure 3-B).

Concerning the control group, in the comparison between male mice (Figure 3-A), a higher number of neuron cell bodies is observed for ARC in relation to PVN. Although ARC usually presents itself in smaller volume than PVN, its cells are also smaller, whereas PVN has divisions according to cellular size and function [14] - magnocellular and parvocellular [19, 36]. The stereological analysis used explains this difference between cell populations: the larger the cell, the fewer units fit within the reticulum [38-40], making ARC more populous than PVN.

Among AAS used in the experiment, Deposteron® is very soluble in lipid, and it is on lipid based environment, unlike Winstrol Depot®, whose vehicle is aqueous, which would make it difficult to cross the blood-brain barrier [28]. As both had statistically equal effects on ARC (Figure 3-B), we can deduce that AAS action in ARC can be exacerbated by the vicinity of this nucleus to one of the circumventricular organs: the median eminence. The ARC is adjacent to this structure, a blood-brain barrier free region that allows greater freedom of flow of substances through fenestrated capillaries [13, 14, 17]. This proximity may make the region a neuronal target more susceptible than PVN, as seen in Figure 3-B.

Another factor already described is the heterogeneity of PVN cellular population [19, 36]

that can react differently to these substances according to the nuclear receptors of their neuron cells which would decrease their direct effects in this hypothalamic nucleus. Although there are no significant changes in PVN neuronal quantification, it is imprudent to say that AAS do not exert an action on this structure, since many afferences that reach the nucleus come from ARC [12, 16, 22].

4.2 Comparison among female mice

At the level of significance of 5%, the results indicate that there was no change in the mean number of neuron cell bodies in female mice ARC and PVN nuclei for the groups evaluated (Figure 4-A). A similar result was obtained when comparing the different groups for each nucleus, ARC and PVN (Figure 4-B).

Differently from female mice (Figure 4-B), male mice suffered significant cellular losses in ARC (Figure 3-B). An important factor to consider is the presence of endogenous testosterone at higher levels in males [1, 43]. In an experiment involving mice, Ribeiro *et al.*, 2014 reported that AAS can modulate nuclear hormone receptors and led to more significant changes in male mice, due to the higher level of circulating testosterone than in female mice [28]. In the literature we found a record of the neurotoxic potential of testosterone and stanozolol, the active ingredient of Winstrol Depot® used in this experiment [4]. Orlando *et al.*, 2007 demonstrated that stanozolol increased neuron cell death induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) [44].

These studies suggest harmful actions of these compounds in the neuron cells and meet our results. In addition, a similar conclusion come from other studies about the effects of AAS on neuron cells of the cerebral cortex of rats [32], rat

hippocampus [45], and cerebellar Purkinje cells of mice [28]. There are also reports involving reduction of dendritic density of the spinal cord [46], confirming the neurotoxicity of AAS [4].

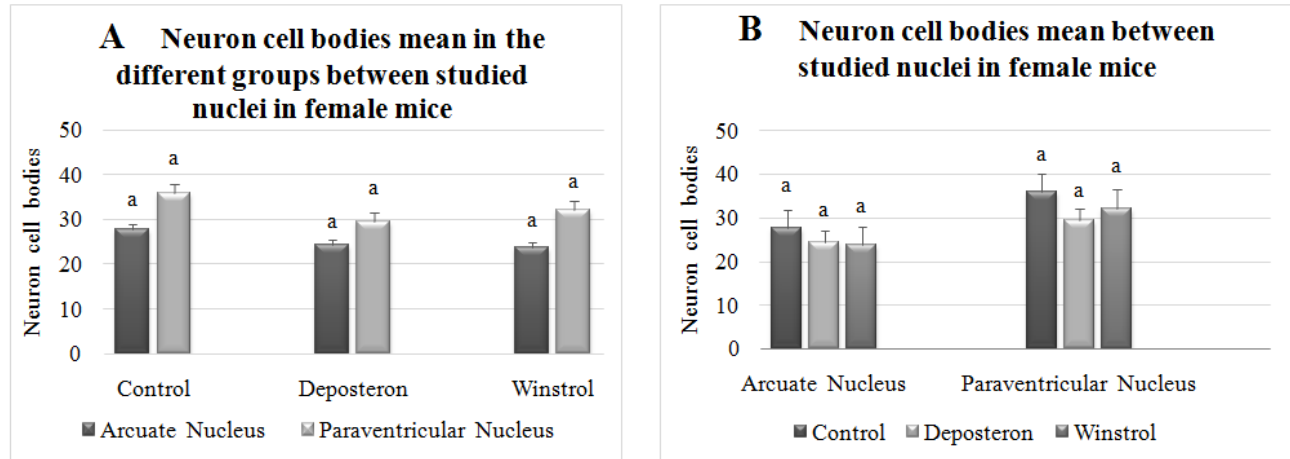


Figure 4 - Chart A: Comparison of the mean number of neuron cell bodies in the different groups between the studied nuclei in female mice and respective standard deviations. Chart B: Comparison of the mean number of neuron cell bodies of the nuclei among the groups in female mice and respective standard deviations. Different letters represent significant differences at level of significance of 5% measured by Tukey test.

The absence of significant effects on female mice can be explained by the neuroprotection factor of endogenous female hormones. The 17 β -estradiol (E2) steroid regulates many aspects of homeostasis by means of central mechanisms via ER α nuclear steroid receptor, which is highly expressed in ARC [19, 47]. Some studies relate the protection of estradiol against excess glutamate (potentially neurotoxic) in brain ischemic stroke and hypoxia [6, 48, 49]. There is also a report of neuron cell protection against glutamate-induced cell death in hippocampal neuron cells of guinea pigs [50].

4.3 Comparison between male and female mice

The results provide an overview for the quantification of neuron cell bodies between male and female mice according to the group and studied areas. Figure 5-A shows that for ARC, when comparing male and female animals within control group, there was a significant difference ($p=0.005$), being the mean number of male mice neuron cell bodies (41.49 ± 13.9) greater than that of female ones (27.78 ± 6.06). For AAS groups there was no significant change in quantification.

In relation to neuron cell bodies of the PVN there was no statistically significant difference when comparing male and female mice among the different groups (Figure 5-B). In the general

comparison between male and female mice, dimorphism is observed in control group for ARC, so that the nucleus in females has a smaller number of cells than in males (Figure 5-A). A detailed study with rats found similar results, however females presented more cells than males in PVN [51], a different result of the present study (Figure 5-B). A classic human study found no statistical difference between sexes when evaluating nucleus volume, mean diameter, cell density and total number of neuron cells [34]. Current reports compare specific groups of neuron cells between sexes [19, 52], neurotransmitters or receptors [47, 53], but do not provide information on differences in total neuronal quantification.

The highest number of neuron cells found in male ARC of control group (Figure 5-A) can also be explained by the relation of the nucleus to sex steroids. Energy balance and body composition mediated by ARC are influenced by sexual steroids, so there is dimorphism between the nuclei according to sex for humans and for animal models [13, 52].

It is important to emphasize the performance of the ARC for metabolism since it acts on the integration of peripheral and central signals to control homeostasis. Under the control of appetite regulating hormones (leptin, insulin and ghrelin), it can activate groups of food-controlling neurons

[19]. As leptin is produced by white adipose tissue in approximate proportion to triglyceride reserves, it provides the hypothalamus with conditions to control energy expenditure and thermogenesis. ARC efferences follow their pathways, including for PVN [14]. Besides these functions, we can

also mention the autonomic activation of cardiovascular activity after ARC stimulation, which is mediated by PVN efferences [17, 23], as well as thyroid hormone [25], adrenal corticosteroids [24] and hydromineral control [23].

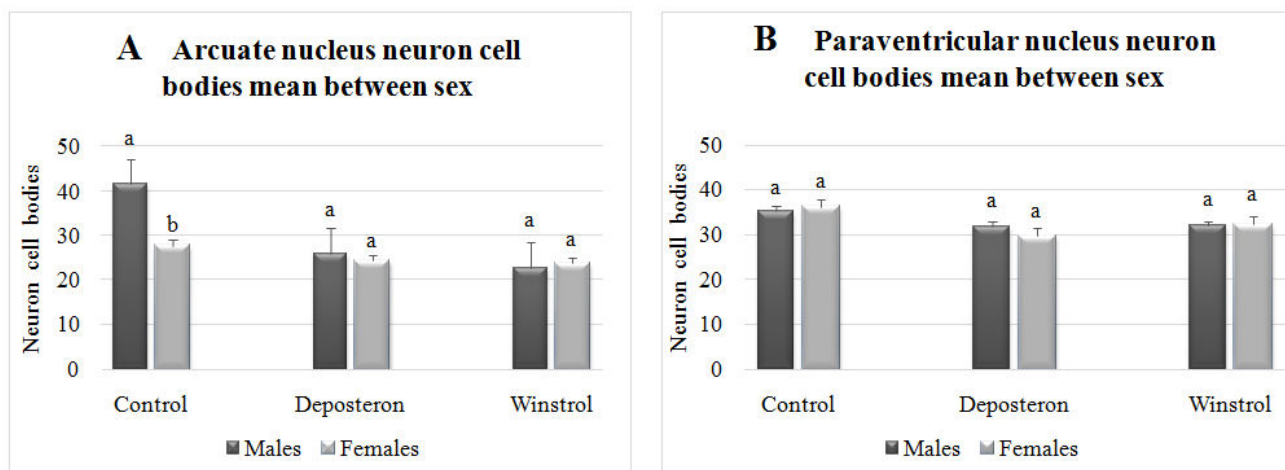


Figure 5 - Comparison of neuron cell bodies mean in the different groups between sexes for Arcuate Nucleus (ARC) - Chart A - and Paraventricular Nucleus (PVN) - Chart B - and their respective standard deviations. Different letters represent significant differences at level of significance of 5% measured by Tukey test.

Although the results are significant only in male mice (Figure 3-B x Figure 4-B, they indicate that AAS abusive use leads to consequences such as ARC neuron cells death that may influence, at least in part, the main aesthetic effect expected from these drugs among non-athletes: change in body composition (fat reduction and increase in lean mass) [1, 6, 8]. However, loss of ARC neuron cells could also be related to the many adverse effects of AAS, such as thyroid malfunction [1], water retention, cardiovascular alterations and hypertension [1, 4, 6, 8], in addition to changes in lipid profile, fertility reduction, and libido fluctuations [1, 6, 8].

To further elucidate the effects that can be provoked by AAS abusive use, other researchers are suggested to understand how these drugs are capable of influencing the connections involving ARC and PVN. For this analysis, longer-term exposure studies and other biochemical or molecular methods would be required to evaluate the chemical substances involved that can be synthesized and released by AAS administration-induced.

5. CONCLUSION

There was reduction of neuron cell bodies of

the Arcuate Nucleus (ARC) for both substances in male animals; however, there was no statistical difference in relation to Paraventricular Nucleus (PVN) when compares the treated groups with control. Compared with the control group, the female mice presented no significant difference in neuron cells quantification for any nuclei, independently of the drug involved. There was also no statistically significant difference in the number of neuronal cell bodies of the ARC or PVN when comparing males and females treated with Winstrol® or Deposteron®.

STANDARD PROTOCOL ON APPROVALS, REGISTRATIONS, AND ANIMAL PROTECTION

The experiment is in accordance with ethical principles, having been appraised and approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of Federal University of Alfenas (CEUA-UNIFAL-MG) under registration number 414/2012.

The authors also confirm that all procedures followed in the research were in accordance with the standards set forth in the eighth edition of "Guide for the care and use of laboratory animals"

(grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals_prepub.pdf) published by the National Academy of Sciences, The National Academies Press, Washington, D.C.

CONFLICT OF INTEREST

This study was financially supported by Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (Capes) of Brazil Government.

The authors assume that there is nothing else to disclosure.

REFERENCES

1. Kersey RD, Elliot DL, Goldberg L, Kanayama G, Leone JE, Pavlovich M, *et al.* National athletic trainers' association position statement: Anabolic-androgenic steroids. *J Athl Train.* 2012;47(5):567-88.
2. Rocha M, Aguiar F, Ramos H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 2014;9(2):98-105.
3. Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG, Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction.* 2009;104(12):1966-78.
4. Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2015;13(1):132-45.
5. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses.* 2016;93:150-3.
6. Pope HG, Jr., Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews.* 2014;35(3):341-75.
7. Kahn A. Regaining lost youth: the controversial and colorful beginnings of hormone replacement therapy in aging. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2005;60(2):142-7.
8. Dotson JL, Brown RT. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatric clinics of North America.* 2007;54(4):761-9.
9. Busardo FP, Frati P, Sanzo MD, Napoletano S, Pinchi E, Zaami S, *et al.* The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2015;13(1):122-31.
10. Tucci P, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, Cuomo V, *et al.* Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. *Steroids.* 2012;77(3):269-75.
11. Liao GY, Li Y, Xu B. Ablation of TrkB expression in RGS9-2 cells leads to hyperphagic obesity. *Molecular metabolism.* 2013;2(4):491-7.
12. Bouret SG. Organizational actions of metabolic hormones. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2013;34(1):18-26.
13. Cornejo MP, Hentges ST, Maliqueo M, Coirini H, Becu-Villalobos D, Elias CF. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(7).
14. Sutton AK, Myers MG, Jr., Olson DP. The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:207-21.
15. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature neuroscience.* 2012;15(10):1350-5.
16. Liao GY, Bouyer K, Kamitakahara A, Sahibzada N, Wang CH, Rutlin M, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is required for axonal growth of selective groups of neurons in the arcuate nucleus. *Molecular metabolism.* 2015;4(6):471-82.
17. Chitravanshi VC, Kawabe K, Sapru HN. GABA and glycine receptors in the nucleus ambiguus mediate tachycardia elicited by chemical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(1):H174-84.
18. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience.* 2005;8(5):571-8.
19. Yasrebi A, Hsieh A, Mamounis KJ, Krumm EA, Yang JA, Magby J, *et al.* Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17beta-estradiol. *Molecular and cellular endocrinology.* 2016;422:42-56.
20. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus -

- a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(6):717-27.
21. Maejima Y, Sakuma K, Santoso P, Gantulga D, Katsurada K, Ueta Y, *et al*. Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Lett*. 2014;588(23):4404-12.
 22. Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 2012;63(1):18-30.
 23. Lozic M, Tasic T, Martin A, Greenwood M, Sarenac O, Hindmarch C, *et al*. Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. *Pharmacol Res*. 2016;114:185-95.
 24. Manojlovic-Stojanoski M, Nestorovic N, Trifunovic S, Ristic N, Jaric I, Filipovic B, *et al*. Dexamethasone exposure affects paraventricular nucleus and pituitary corticotrophs in female rat fetuses: An unbiased stereological and immunohistochemical study. *Tissue Cell*. 2016;48(5):516-23.
 25. Alkemade A. Thyroid hormone and the developing hypothalamus. *Front Neuroanat*. 2015;9:15.
 26. Costine BA, Oberlander JG, Davis MC, Penatti CA, Porter DM, Leaton RN, *et al*. Chronic anabolic androgenic steroid exposure alters corticotropin releasing factor expression and anxiety-like behaviors in the female mouse. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(10):1473-85.
 27. Penatti CA, Porter DM, Henderson LP. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. *J Neurosci*. 2009;29(40):12484-96.
 28. Ribeiro CM, Silva DK, Damião B, Alves DM, Freitas AC, Rossi Junior WC, *et al*. Análise quantitativa de células de Purkinje em camundongos sob o uso dos esteroides anabolizantes. *Rev Neurocienc*. 2014;22(3):432-7.
 29. Wood RI. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(4):490-506.
 30. Inamdar Doddamani LS, Jayamma Y. Acceleration of neutrophil precursors' maturation and immunostimulation of CD3+, CD4+ lymphocytes by stanozolol in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012;129(3-5):172-8.
 31. Rabinowicz T, Petetot JM-C, Khoury JC, de Courten-Myers GM. Neocortical maturation during adolescence: Change in neuronal soma dimension. *Brain and Cognition*. 2009;69(2):328-36.
 32. Damião B, Souza GG, Nogueira DA, Rossi Junior WC, Fernandes GJM, Esteves A. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteroides Anabolizantes. *Rev Neurocienc*. 2012;20(1):68-72.
 33. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016;524(18):3865-95.
 34. Hofman MA, Fliers E, Goudsmit E, Swaab DF. Morphometric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes. *Journal of Anatomy*. 1988;160:127-43.
 35. Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates. Third edition. ed. New York: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2007. 1 volume (unpaged).
 36. Kádár A, Sánchez E, Wittmann G, Singru PS, Füzesi T, Marsili A, *et al*. Distribution of Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Mouse. *The Journal of comparative neurology*. 2010;518(19):3948-61.
 37. Garcia-Cabezas MA, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat*. 2016;10:107.
 38. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75(4):469-86.
 39. Muhlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W. An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)*. 2010;108(5):1402-9.
 40. Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical

- approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology*. 2010;38(7):1011-25.
41. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
 42. Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. ExpDes.pt: Experimental Designs Pacakge (Portuguese). R package version 1.1.2 ed 2013.
 43. Boff S. Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. *R bras Ci e Mov*. 2010;18(1):81-8.
 44. Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, *et al.* Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain research*. 2007;1165:21-9.
 45. Ma F, Liu D. 17beta-trenbolone, an anabolic-androgenic steroid as well as an environmental hormone, contributes to neurodegeneration. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015; 282(1):68-76.
 46. Wallin-Miller K, Li G, Kelishani D, Wood RI. Anabolic-androgenic steroids decrease dendritic spine density in the nucleus accumbens of male rats. *Neuroscience*. 2016;330:72-8.
 47. Brock O, De Mees C, Bakker J. Hypothalamic expression of oestrogen receptor alpha and androgen receptor is sex-, age- and region-dependent in mice. *J Neuroendocrinol*. 2015; 27(4):264-76.
 48. Nunez J. Sex and steroid hormones in early brain injury. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012;13(3):173-86.
 49. Siddiqui AN, Siddiqui N, Khan RA, Kalam A, Jabir NR, Kamal MA, *et al.* Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(5):342-50.
 50. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*. 2008;88(1):91-124.
 51. Lin KH, Peng YM, Peng MT, Tseng TM. Changes in the nuclear volume of rat hypothalamic neurons in old age. *Neuroendocrinology*. 1976;21(3):247-54.
 52. Burke LK, Doslikova B, D'Agostino G, Greenwald-Yarnell M, Georgescu T, Chianese R, *et al.* Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. *Molecular metabolism*. 2016;5(3):245-52.
 53. Zuloaga DG, Zuloaga KL, Hinds LR, Carbone DL, Handa RJ. Estrogen receptor beta expression in the mouse forebrain: age and sex differences. *J Comp Neurol*. 2014;522(2):358-71.

2.2 Quantificação de Corpos Celulares de Neurônios no Núcleo Central e no Complexo Nuclear Basolateral do Corpo Amigdalóide de Camundongos Submetidos ao Tratamento Crônico com Doses Suprafisiológicas de Esteroides Androgênicos Anabolizantes*

Quantification of Neuron Cell Bodies in the Central Nucleus and in the Basolateral Nuclear Complex of the Amygdala of Mice Submitted to Chronic Treatment with Supraphysiological Doses of Anabolic-Androgenic Steroids

Débora Mantoan Alves¹, Valério Landim de Almeida², Fausto Bérzin³, Wagner Costa Rossi Junior⁴, e Alessandra Esteves⁵

1. Biomédica, Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

2. Enfermeiro, Doutorando na área de Anatomia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas –FOP-Unicamp.

3. Cirurgião-dentista, Doutor, Professor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Bucodental na área de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas –FOP-Unicamp.

4. Cirurgião-dentista, Doutor, Docente da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, Alfenas-MG, Brasil.

5. Médica Veterinária, Doutora, Docente da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, Alfenas-MG, Brasil.

*Esse artigo será traduzido para o inglês e submetido para o periódico “Experimental Brain Research”.

Resumo

O uso dos Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs) pela população de forma irregular, sem indicação médica, começou a crescer a partir da década de 1980. Apesar de serem controlados por órgãos governamentais são ilegalmente comercializados e muito consumidos entre os jovens que desejam uma aparência magra e musculosa ou ainda para promover o alívio da fadiga e melhora do desempenho físico, inclusive entre não atletas. Aliado ao consumo indiscriminado dos EAAs, também há evidências sobre seu potencial neurodegenerativo. Alterações comportamentais mediadas pelo corpo amigdalóide como depressão, agressividade e ansiedade são relatadas entre os usuários. O trabalho tem como objetivo avaliar quantitativamente os corpos celulares de neurônios nos núcleos da Amígdala Central (AC) e Basolateral (BLA) do encéfalo de camundongos sob o uso crônico e suprafsiológico isolado e combinado de Durateston® e Deca Durabolin®. Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem Swiss divididos em 4 grupos (n=10): grupo Controle, recebeu solução fisiológica; grupo Dura, foi administrado Deca Durabolin®; grupo Deca, foi administrado Durateston®; e grupo Dura-Deca, foram administrados os dois fármacos. Os animais foram tratados por um período de 60 dias, recebendo os fármacos e praticando natação. Após esse período os camundongos foram eutanasiados e tiveram os encéfalos removidos. O material passou por processamento histológico e coloração. Para a análise quantitativa de corpos celulares de neurônios empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples. Os resultados mostraram que houve redução significativa no número de neurônios para todos os animais tratados com os EAAs em relação ao grupo Controle: Para a BLA a redução variou de 23% a 36% conforme o grupo; Para a AC, a redução variou de 20% a 29% conforme o grupo. Conclui-se que a administração de doses suprafsiológicas desses EAAs provoca redução do número de corpos de neurônios da BLA e AC nos camundongos machos.

Palavras-chave: Esteroides. Núcleo Central da Amígdala. Complexo Nuclear Basolateral da Amígdala. Camundongos.

INTRODUÇÃO

Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs)

Também chamados de Esteroides Andrógenos Anabolizantes ou ainda Esteroides Andrógenos (ou Androgênicos) Anabólicos (Mooradian et al., 1987) essas substâncias referem-se aos hormônios esteroides pertencentes à classe dos hormônios sexuais masculinos (Shahidi, 2001). Responsáveis pelos efeitos androgênicos (masculinizantes) atuam tanto na promoção quanto na manutenção das características sexuais masculinas (Kersey et al., 2012; Rocha et al., 2014). Dentre os hormônios androgênicos, destaca-se a testosterona, produzida pelas células de Leydig nos testículos e em menor quantidade nos ovários e na glândula suprarrenal (Kersey et al., 2012). Além de atuar na reprodução e na libido, a testosterona exerce alterações somáticas em diversas estruturas: são conhecidas suas ações no desenvolvimento muscular, no crescimento ósseo, na redução da gordura corporal (Rocha et

al., 2014), e também se distribui nos tecidos renal, hematopoiético e nervoso (Kersey et al., 2012).

O potencial terapêutico da testosterona vem sendo amplamente explorado na clínica desde sua síntese a partir do colesterol em 1935 (Dotson e Brown, 2007). Nesse contexto, seus derivados sintéticos, os chamados Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs) começaram a ser desenvolvidos com alterações moleculares para redução dos efeitos androgênicos e incremento dos anabólicos (Kersey et al., 2012). Esses derivados sintéticos são usados para controlar deficiências hormonais e como adjuvantes no tratamento de doenças crônicas debilitantes em alguns casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), anemias, osteoporose e câncer (Busardo et al., 2015).

Devido a suas propriedades anabólicas, especialmente no que diz respeito à aceleração do desenvolvimento muscular e menor tempo de recuperação pós-exercício, o uso desses fármacos se tornou relativamente comum entre atletas até ser banido pelo Comitê Olímpico Internacional em 1974 (Dotson e Brown, 2007).

Nos últimos anos, alguns países têm adotado severas regras para a distribuição e comercialização dessas substâncias, entretanto os EAAs são comercializados ilegalmente e seu consumo entre não atletas começou a se intensificar (Kersey et al., 2012; Tucci et al., 2012; Busardo et al., 2015; Pomara et al., 2015).

O uso abusivo e ilícito dos EAAs ocorre entre os frequentadores de academia que visam aumento da massa muscular. Nestas condições, os EAAs são geralmente administrados por períodos chamados ciclos, que duram em média 8 a 16 semanas, separados por um tempo de repouso na tentativa de reduzir os efeitos adversos dessas substâncias (Kanayama et al., 2009). Geralmente a substância é administrada pelo próprio usuário por dois métodos: o primeiro, chamado “empilhamento” (*stacking*) em que há consumo de duas ou mais substâncias simultaneamente nesse período; o segundo, “pirâmide” (*pyramiding*) em que se inicia com uma dosagem baixa até alcançar níveis que podem superar de 10 a 100 vezes as doses terapêuticas recomendadas, com retorno gradual à dose inicial (Kanayama et al., 2009; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014).

Na pressa para a obtenção do corpo perfeito, os efeitos deletérios dessas substâncias são negligenciados pela população. Muitos usuários apresentam acne, atrofia testicular e ginecomastia (Pope et al., 2014). Além disso, pode ocorrer hipertrofia de clitóris, hipertensão arterial e hipertrofia ventricular esquerda, além de danos ao tecido hepático, distúrbios hematológicos e neurológicos (Pope et al., 2014). Dentre os efeitos no sistema nervoso central são relatadas alterações funcionais e comportamentais com destaque para a

irritabilidade, agressividade, ansiedade, depressão e sintomas cognitivos como esquecimento, distrações e confusão (Pope et al., 2014; Pomara et al., 2015).

Corpo Amigdalóide

A regulação da emoção e de comportamentos relacionados a desordens como ansiedade, depressão e agressão dependem de circuitos neuronais que envolvem o corpo amigdalóide (Vann, 2013; Duvarci e Pare, 2014). O corpo amigdalóide (amigdalóide = semelhante à amêndoa) compreende um complexo bilateral de núcleos localizados na região anteromedial do lobo temporal e pode ser organizado em três regiões: Amígdala Basolateral, Amígdala Central e um grupo celular esparsa chamado de “massas de células intercaladas” (McDonald, 1998; Duvarci e Pare, 2014). Nos animais sua localização é extremamente similar à descrita e possui organização semelhante em todos os mamíferos (McDonald, 1998).

A Amígdala Basolateral (BLA) é o principal local de chegada das aferências ao corpo amigdalóide. Já a Amígdala Central (AC) estabelece conexões eferentes com hipotálamo, tronco encefálico e outras estruturas do sistema nervoso central ao passo que as massas de células intercaladas modulam de forma inibitória as conexões nucleares (Duvarci e Pare, 2014).

O corpo amigdalóide também é responsável pela detecção, geração e manutenção das emoções relacionadas ao medo, e coordenação de respostas apropriadas à ameaça e ao perigo (Hoistad e Barbas, 2008; Duvarci e Pare, 2014). Ele capta informações de todos os sistemas sensoriais e as projeta de forma específica aos núcleos amigdalianos, permitindo a integração das instruções provenientes das diversas áreas cerebrais, por meio de conexões excitatórias e inibitórias (Williams et al., 2006).

Muitos jovens e adultos fazem uso irregular dos EAAs na busca por melhorias no desempenho físico e por uma aparência musculosa de forma imediatista sem se preocupar com os efeitos negativos que esses medicamentos podem acarretar à saúde (Pomara et al., 2015). Estados mentais de ansiedade, agressividade e depressão dependem de circuitos mediados pelo corpo amigdalóide (Duvarci e Pare, 2014) que sofrem alterações decorrentes de lesões em seus núcleos.

O trabalho tem como objetivo avaliar quantitativamente os corpos celulares de neurônios da Amígdala Basolateral (BLA) e Central (AC) de camundongos sob o uso crônico com doses supra-fisiológicas isoladas e combinadas de Deca Durabolin® e Durateston® comparados ao grupo tratado com solução fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da pesquisa e amostra animal

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem Swiss com 90 dias de idade (jovens adultos) e peso corporal entre 40 e 50 gramas. Foram alojados em caixas individuais, tratados com ração comercial, água *ad libitum* e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro.

O trabalho está em conformidade com os princípios éticos, tendo sido apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UNIFAL-MG) sob registro nº 479/2012.

O tratamento farmacológico consistiu na aplicação intraperitoneal (Penatti et al., 2009; Costine et al., 2010; Ribeiro et al., 2014) de dois esteroides anabolizantes isolados ou combinados: Deca Durabolin® (decanoato de nandrolona) e Durateston® (associação de: propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona) do laboratório Landerlan. As doses (Wood, 2008; Inamdar Doddamani e Jayamma, 2012) estão descritas na Tabela 1. Os esteroides foram aplicados no mesmo horário, uma vez por semana (às terças-feiras), durante 60 dias. Nos grupos Controle foi administrada solução fisiológica em mesmo volume que as aplicações isoladas dos fármacos (Ribeiro et al., 2014).

Tabela 1 - Grupos de animais conforme substância injetada e dosagem.

Grupos	Total de animais	Substância injetada	Dosagem	Treinamento
Controle	10 machos	Solução fisiológica 0,9%	0,02ml	Natação
Dura	10 machos	Durateston®	83,3mg/Kg	Natação
Deca	10 machos	Deca Durabolin®	16,7mg/kg	Natação
Dura-Deca	10 machos	Durateston® + Deca Durabolin®	83,3mg/Kg 16,7mg/kg	Natação

Durante o tratamento farmacológico, os animais foram submetidos à natação por 5 minutos, três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), em um recipiente de plástico medindo 43x34x26cm, contendo água à temperatura de 24-26°C e a uma altura

suficiente para que os animais não conseguissem sair do recipiente nem se apoiar em seu fundo (Ribeiro et al., 2014).

Decorridos 60 dias, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano para posterior craniotomia. Os encéfalos foram removidos inteiramente, lavados em solução fisiológica e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato por vinte e quatro horas (Rabinowicz et al., 2009). Após esse período, procedeu-se a sequência padronizada nos processamentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

De cada encéfalo foram retiradas amostras seriadas e homotípicas em cortes frontais (Damião et al., 2012; von Bartheld et al., 2016) com espessura de 7µm em micrótomo Yidi YD-315. Para avaliar as áreas estabelecidas para o estudo (Franklin e Paxinos, 2007), o material foi corado com violeta cresil (Kádár et al., 2010; von Bartheld et al., 2016). Essa técnica permite a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios, o que possibilita marcar forte e individualmente cada célula para posterior contagem em microscopia óptica (Kádár et al., 2010; Damião et al., 2012; Garcia-Cabezas et al., 2016).

Para a análise quantitativa de corpos celulares de neurônios, empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Boyce et al., 2010; Muhlfeld et al., 2010).

A determinação das áreas estudadas confere com a representação da imagem 43 do atlas de estereotaxia de Franklin e Paxinos (Franklin e Paxinos, 2007): a Amígdala Basolateral (BLA) se encontra em um plano frontal, no qual é possível observar os ventrículos laterais, o terceiro ventrículo dorsal e ventral e o giro do cíngulo invaginando em direção ao corpo caloso. Somada a essas referências, a BLA possui como característica um formato bem delimitado em “gota” (Figura 1). Para a Amígdala Central, basta observar, nesse mesmo plano, um adensamento de corpos de neurônios mediais à BLA.

Cada divisão do corpo amigdalóide (BLA ou AC) teve duas áreas quantificadas por hemisfério, totalizando 4 áreas por corte. Para evitar a contagem da mesma célula mais de uma vez, foram analisados 3 cortes semi-seriados por animal, totalizando 12 campos histológicos por núcleo estudado para cada animal. Como foram quantificadas duas divisões (BLA) e (AC), obteve-se um total de 24 áreas por animal. Assim, para a amostra utilizada, foi quantificado o total de 960 áreas em um aumento de 400 vezes.

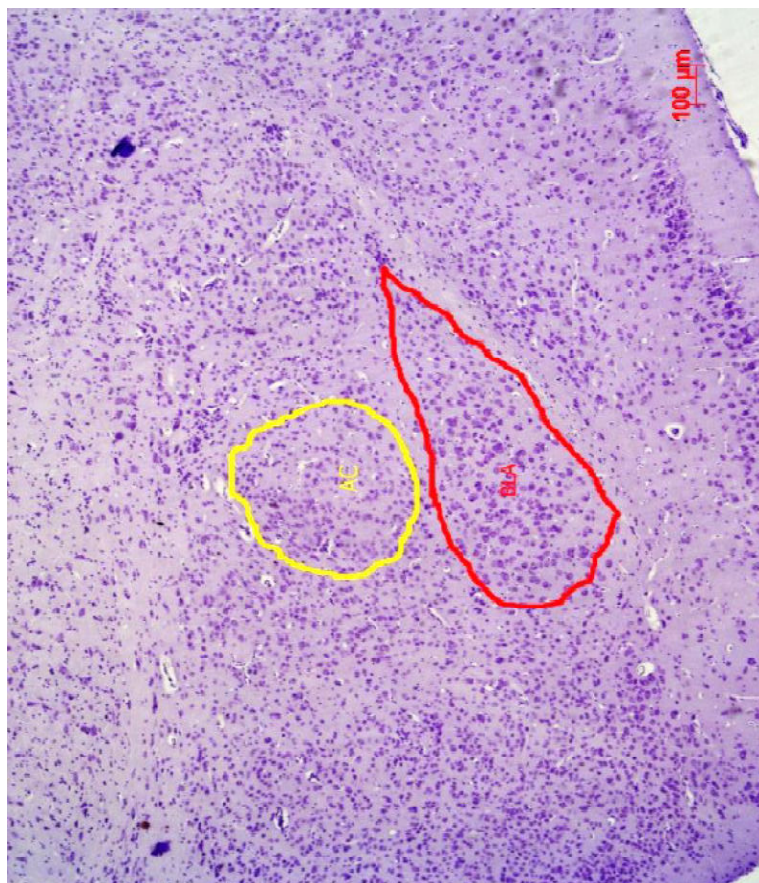


Figura 1 – Fotomicrografia de corte frontal de cérebro de camundongo corado com violeta cresil, ilustrando as áreas estudadas: AC (Amígdala Central e BLA (Amígdala Basolateral). Aumento de 50x. Imagem do autor.

A contagem foi feita com auxílio de uma área teste (*counting frame*) medindo 120,75 cm². Foram quantificados os corpos celulares que apresentavam nucléolo, dispostos dentro da área teste e na linha de inclusão (tracejada em verde). Foram excluídas as células nas linhas contínuas em vermelho (Mandarim-de-Lacerda 2003, Damião, Souza et al. 2012, Ribeiro, Silva et al. 2014) (Figura 2). Todas as análises foram feitas em um computador com o Sistema Analisador de Imagens *Axiovision4 Module Interactive Measurement* acoplado ao microscópio *AxioScope A1* da Carl Zeiss®.

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (One-Way ANOVA), seguida do teste de comparações de médias de Tukey. Utilizou-se o software *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e foi adotado o nível de significância de 5% para todas as análises.

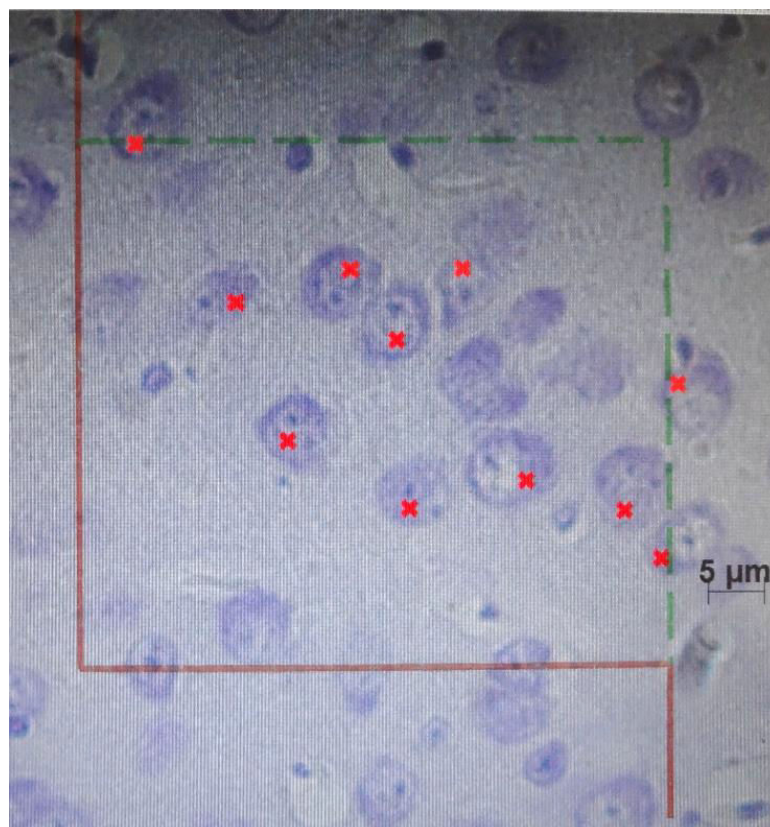


Figura 2 – Área teste utilizada (counting frame). Foram quantificadas somente células inseridas no quadrante ou na linha tracejada, excluindo-se as que tocassem a linha contínua. Imagem do autor.

RESULTADOS

Amígdala Basolateral (BLA)

Houve redução significativa da média de corpos celulares de neurônios ao se comparar os grupos que receberam os EAAs com o controle. Na Tabela 2 é possível observar os valores absolutos da média da quantificação de corpos celulares de neurônios com seu desvio-padrão, os resultados do teste de Tukey e a porcentagem de redução do número de corpos de neurônios para os grupos comparados.

A Tabela 2 fornece um panorama dos dados, comprovando a redução significativa do número de corpos de neurônios da BLA pelo teste de Tukey. Não há diferença estatística entre os grupos que receberam Durateston® (grupo Dura), Deca Durabolin® (grupo Deca) e a combinação Durateston® e Deca Durabolin® (grupo Dura-Deca).

Tabela 2 - Médias e desvio-padrão da quantificação de corpos celulares de neurônios da Amígdala Basolateral (BLA).

Grupos	Quantificação na BLA	Teste de Tukey*	Porcentagem de redução
Controle	10,95 $\pm$ 2,62	a	-
Dura	8,38 $\pm$ 1,88	b	23,47%
Deca	8,20 $\pm$ 1,91	b	25,11%
Dura-Deca	6,97 $\pm$ 1,85	b	36,35%

*Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Amígdala Central (AC)

Houve redução significativa da média de corpos celulares de neurônios ao se comparar os grupos que receberam os EAAs com o Controle. Na Tabela 3 é possível observar os valores absolutos da média da quantificação de corpos celulares de neurônios com seu desvio-padrão, os resultados do teste de Tukey e a porcentagem de redução do número de corpos de neurônios entre os grupos comparados.

A Tabela 3 fornece um panorama dos dados comprovando a redução significativa do número de corpos de neurônios da AC pelo teste de Tukey. Não há diferença estatística entre os grupos que receberam Durateston® (grupo Dura), Deca Durabolin® (grupo Deca) e a combinação Durateston® e Deca Durabolin® (grupo Dura-Deca).

Tabela 3 - Médias e desvio-padrão da quantificação de corpos celulares de neurônios da Amígdala Central (AC)

Grupos	Quantificação na BLA	Teste de Tukey*	Porcentagem de redução*
Controle	24,78 $\pm$ 2,36	a	-
Dura	19,73 $\pm$ 3,02	b	20,38%
Deca	18,92 $\pm$ 1,77	b	23,65%
Dura-Deca	17,61 $\pm$ 2,18	b	28,93%

*Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância.

DISCUSSÃO

A redução na densidade de corpos de neurônios pelo uso de doses suprafisiológicas de EAAs na Amígdala Basolateral (BLA) e Central (AC) sugerem efeito

neurotóxico dessas substâncias (Pomara et al., 2015) e são indicativos de morte neuronal (Caraci et al., 2011). Carmo et al., 2012 relatam que concentrações elevadas de metabólitos de EAAs e de testosterona podem alterar os neurônios, provocando modificações bioquímicas, funcionais e morfológicas, culminando na morte celular (Carmo et al., 2012). Estudando os efeitos potencialmente neurodegenerativos de EAAs, Scaccianoce, 2013 relata o aumento na suscetibilidade a estímulos apoptóticos neuronais na presença de altas doses dessas substâncias (Scaccianoce et al., 2013).

Áreas cerebrais fundamentalmente envolvidas nas respostas emocionais e no comportamento agressivo apresentam dentre seus neurotransmissores, dopamina e serotonina (Wommack e Delville, 2002; Pirnik e Kiss, 2005), sendo a presença de ambas confirmada no corpo amigdalóide (Schwartz e Melloni, 2010; Wassum e Izquierdo, 2015). Essas monoaminas são afetadas em experimentos animais com uso de EAAs: Tucci et al. encontraram níveis reduzidos de dopamina e serotonina no prosencéfalo de ratos que receberam o uso crônico e abusivo de estanozolol (Tucci et al., 2012). Ricci et al. trabalhando com doses de três EAAs em hamsters, observaram níveis reduzidos de serotonina no corpo amigdalóide dos animais (Ricci et al., 2012).

O uso abusivo de esteroides anabolizantes reduz os níveis de RNA mensageiro de receptores de serotonina no córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e no corpo amigdalóide (Ambar e Chiavegatto, 2009). A menor captação dessas substâncias fornece pistas sobre alterações comportamentais (ansiedade, agressividade e comportamento competitivo) apresentadas pelos usuários de doses suprafisiológicas de EAAs (Pope et al., 2014; Pomara et al., 2015).

Apesar de subcorticais, neurônios da BLA se assemelham bastante aos do córtex cerebral, havendo duas subpopulações de destaque: um grupo majoritário de neurônios de projeção, que utiliza o glutamato como neurotransmissor excitatório, e, em menor proporção, interneurônios esparsos, que utilizam o ácido gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmissor inibitório (McDonald e Zaric, 2015). Os neurônios da AC possuem múltiplos dendritos, que se ramificam profusamente, sendo, em sua maioria, neurônios de projeção, embora exista um grupo celular relacionado aos circuitos internos do corpo amigdalóide. Ainda que principalmente GABAérgica, a neurotransmissão glutamatérgica também é relatada no núcleo central da amígdala, sofrendo aumento em resposta à ansiedade e a estressores agudos (Silberman e Winder, 2013; Silberman et al., 2015).

A excitabilidade do corpo amigdalóide é mediada principalmente por sinalização glutamatérgica, que pode ser aumentada por diferentes condições (Benini e Avoli, 2006;

Rosenkranz et al., 2010; Tran et al., 2013). A queda na concentração de serotonina no corpo amigdalóide provocada pelo uso de EAAs (Ricci et al., 2012; Tucci et al., 2012) pode induzir mudanças como o aumento da expressão do receptor de glutamato GluR1, o que favorece a neurotransmissão glutamatérgica gerando hiperexcitabilidade neuronal (Tran et al., 2013). Há trabalhos sugerindo que o consumo de doses supra fisiológicas de EAAs eleva a transmissão glutamatérgica, aumentando a probabilidade de ligação com seu receptor agonista, N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Fischer, Ricci e Melloni Júnior, 2007; Ventriglia e Di Maio, 2013; Siddiqui et al., 2016).

Orlando et al. (2007) descreveram o efeito da testosterona e de três de seus derivados (nandrolona, estanozolol e gestrinona) sobre a morte neuronal induzida por NMDA em culturas primárias de células do córtex de ratos, sugerindo que altas doses da testosterona aumentam a vulnerabilidade neuronal, ocorrendo uma maior citotoxicidade e facilitando a morte celular (Orlando et al., 2007). Caraci et al., 2011 observaram resultados semelhantes de neurotoxicidade de EAAs em cultura de neurônios corticais (Caraci et al., 2011). A liberação excessiva de glutamato e sobreativação de receptores NMDA que ocorre em certas condições provoca um aumento de Ca^{2+} intracelular. Se não for impedida, a supraestimulação dos receptores de glutamato resulta num aumento secundário e sustentado da concentração intracelular de Ca^{2+} , considerado um ponto de não retorno no disparo da morte celular (Sattler e Tymianski, 2000; Araujo et al., 2010; Wang et al., 2012).

Um dos resultados esperados era de que no grupo tratado com os anabolizantes combinados Durateston® e Deca houvesse uma redução de neurônios em relação aos demais tratamentos farmacológicos, entretanto não houve diferença significativa, o que pode ser explicado devido a uma possível saturação dos receptores. O aumento da quantidade de receptores não ocorreu na mesma proporção que a concentração do ligante (EAAs), podendo esclarecer o resultado não significativo para essa avaliação (Venkitakrishnan et al., 2012; Lin et al., 2013).

Para melhor conhecimento dos efeitos neurotóxicos acarretados pelo uso de doses supra fisiológicas de esteroides androgênicos anabolizantes (EAAs) sugerem-se novas pesquisas envolvendo características bioquímicas e/ou moleculares dessas substâncias no sistema nervoso central. Assim, seriam mais bem compreendidas as mudanças comportamentais relatadas pelos usuários de EAAs relacionadas às alterações do corpo amigdalóide como, por exemplo, ansiedade, medo, agressividade e até transtornos obsessivos e síndrome do pânico.

CONCLUSÃO

Os resultados da quantificação neuronal demonstraram que houve diminuição do número de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral e na Amígdala Central de camundongos sob o uso de doses suprafisiológicas isoladas e combinadas de Deca Durabolin® e Durateston® para ambas as substâncias testadas, isoladamente e combinadas.

REFERÊNCIAS

- 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 Behav.* 2009; 8(2): 161-173.
- Araujo IM, Carreira BP, Carvalho CM, Carvalho AP. Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity. *Neurochem Res.* 2010; 35(12): 1966-1969.
- Benini R, Avoli M. Altered inhibition in lateral amygdala networks in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol.* 2006; 95(4): 2143-2154.
- Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol.* 2010; 38(7): 1011-1025.
- Busardo FP, Frati P, Sanzo MD, Napoletano S, Pinchi E, Zaami S, et al. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(1): 122-131.
- Caraci F, Pistara V, Corsaro A, Tomasello F, Giuffrida ML, Sortino MA, et al. Neurotoxic properties of the anabolic androgenic steroids nandrolone and methandrostenolone in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res.* 2011; 89(4): 592-600.
- Carmo CA, Goncalves AL, Salvadori DM, Maistro EL. Nandrolone androgenic hormone presents genotoxic effects in different cells of mice. *J Appl Toxicol.* 2012; 32(10): 810-814.
- Costine BA, Oberlander JG, Davis MC, Penatti CA, Porter DM, Leaton RN, et al. Chronic anabolic androgenic steroid exposure alters corticotropin releasing factor expression and anxiety-like behaviors in the female mouse. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35(10): 1473-1485.
- Damião B, Souza GG, Nogueira DA, Rossi Junior WC, Fernandes GJM, Esteves A. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteroides Anabolizantes. *Rev Neurocienc.* 2012; 20(1): 68-72.
- Dotson JL, Brown RT. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatr Clin North Am.* 2007; 54(4): 761-769.
- Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron.* 2014; 82(5): 966-980.
- Fischer SG, Ricci LA, Melloni RH, Jr. Repeated anabolic/androgenic steroid exposure during adolescence alters phosphate-activated glutaminase and glutamate receptor 1 (GluR1) subunit

immunoreactivity in Hamster brain: correlation with offensive aggression. *Behav Brain Res.* 2007; 180(1): 77-85.

Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York, Academic Press, an imprint of Elsevier. 2007.

Garcia-Cabezas MA, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat.* 2016; 10: 107.

Hoistad M, Barbas H. Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. *Neuroimage.* 2008; 40(3): 1016-1033.

Inamdar Doddamani LS, Jayamma Y. Acceleration of neutrophil precursors' maturation and immunostimulation of CD3+, CD4+ lymphocytes by stanozolol in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 129(3-5): 172-178.

Kádár A, Sánchez E, Wittmann G, Singru PS, Füzesi T, Marsili A, et al. Distribution of Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Mouse. *The Journal of comparative neurology.* 2010; 518(19): 3948-3961.

Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG, Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction.* 2009; 104(12): 1966-1978.

Kersey RD, Elliot DL, Goldberg L, Kanayama G, Leone JE, Pavlovich M, et al. National athletic trainers' association position statement: Anabolic-androgenic steroids. *Journal of Athletic Training.* 2012; 47(5): 567-588.

Lin AH, Li RW, Ho EY, Leung GP, Leung SW, Vanhoutte PM, et al. Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor-alpha isoforms. *PLoS One.* 2013; 8(4): 1-9.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003; 75(4): 469-486.

McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 1998; 55(3): 257-332.

McDonald AJ, Zaric V. Extrinsic origins of the somatostatin and neuropeptide Y innervation of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience.* 2015; 294: 82-100.

Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1): 1-28.

Muhlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W. An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *J Appl Physiol (1985).* 2010; 108(5): 1402-1409.

Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain Research.* 2007; 1165: 21-29.

Penatti CA, Porter DM, Henderson LP. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. *J Neurosci.* 2009; 29(40): 12484-12496.

- Pirnik Z, Kiss A. Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull.* 2005; 65(5): 423-431.
- Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(1): 132-145.
- Pope HG, Jr., Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2014; 35(3): 341-375.
- Rabinowicz T, Petetot JM-C, Khoury JC, de Courten-Myers GM. Neocortical maturation during adolescence: Change in neuronal soma dimension. *Brain and Cognition.* 2009; 69(2): 328-336.
- Ribeiro CM, Silva DK, Damião B, Alves DM, Freitas AC, Rossi Junior WC, et al. Análise quantitativa de células de Purkinje em camundongos sob o uso dos esteroides anabolizantes. *Rev Neurocienc.* 2014; 22(3): 432-437.
- Ricci LA, Morrison TR, Melloni RH, Jr. Serotonin modulates anxiety-like behaviors during withdrawal from adolescent anabolic-androgenic steroid exposure in Syrian hamsters. *Horm Behav.* 2012; 62(5): 569-578.
- Rocha M, Aguiar F, Ramos H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 2014; 9(2): 98-105.
- Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol Psychiatry.* 2010; 67(12): 1128-1136.
- Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl).* 2000; 78(1): 3-13.
- Scaccianoce S, Caruso A, Miele J, Nistico R, Nicoletti F. Potential neurodegenerative effect of anabolic androgenic steroid abuse. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013; 27(2 Suppl): 107-114.
- Schwartz JJ, Melloni RH, Jr. Dopamine activity in the lateral anterior hypothalamus modulates AAS-induced aggression through D2 but not D5 receptors. *Behav Neurosci.* 2010; 124(5): 645-655.
- Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther.* 2001; 23(9): 1355-1390.
- Siddiqui AN, Siddiqui N, Khan RA, Kalam A, Jabir NR, Kamal MA, et al. Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. *CNS Neurosci Ther.* 2016; 22(5): 342-350.
- Silberman Y, Fetterly TL, Awad EK, Milano EJ, Usdin TB, Winder DG. Ethanol produces corticotropin-releasing factor receptor-dependent enhancement of spontaneous glutamatergic transmission in the mouse central amygdala. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015; 39(11): 2154-2162.
- Silberman Y, Winder DG. Corticotropin releasing factor and catecholamines enhance glutamatergic neurotransmission in the lateral subdivision of the central amygdala. *Neuropharmacology.* 2013; 70: 316-323.
- Tran L, Lasher BK, Young KA, Keele NB. Depletion of serotonin in the basolateral amygdala elevates glutamate receptors and facilitates fear-potentiated startle. *Transl Psychiatry.* 2013; 3: 2-8.

- Tucci P, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, Cuomo V, et al. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. *Steroids*. 2012; 77(3): 269-275.
- Vann SD. Dismantling the Papez circuit for memory in rats. *Elife*. 2013; 2: e00736.
- Venkitakrishnan RP, Benard O, Max M, Markley JL, Assadi-Porter FM. Use of NMR saturation transfer difference spectroscopy to study ligand binding to membrane proteins. *Methods Mol Biol*. 2012; 914: 47-63.
- Ventriglia F, Di Maio V. Effects of AMPARs trafficking and glutamate-receptors binding probability on stochastic variability of EPSC. *Biosystems*. 2013; 112(3): 298-304.
- von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016; 524(18): 3865-3895.
- Wang Y, Zyskind JW, Colacurcio DJ, Lindl KA, Ting JH, Grigoriev G, et al. Differential roles for caspase-mediated and calpain-mediated cell death in 1- and 3-week-old rat cortical cultures. *Neuroreport*. 2012; 23(18): 1052-1058.
- Wassum KM, Izquierdo A. The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 57: 271-283.
- Williams LM, Das P, Liddell BJ, Kemp AH, Rennie CJ, Gordon E. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. *J Neurosci*. 2006; 26(36): 9264-9271.
- Wommack JC, Delville Y. Chronic social stress during puberty enhances tyrosine hydroxylase immunoreactivity within the limbic system in golden hamsters. *Brain Res*. 2002; 933(2): 139-143.
- Wood RI. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29(4): 490-506.

3 DISCUSSÃO

São conhecidas as relações deletérias somáticas provocadas por elevadas doses de EAAs. A recente literatura consultada é unânime em afirmar que muitas dessas alterações derivam da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, afetando a produção e/ou a secreção de hormônios reguladores da tireoide, das gônadas, controladores do equilíbrio hídrico, e das funções cardiovasculares (Alkemade, 2015; Chitravanshi et al., 2015; Lozic et al., 2016; Manojlovic-Stojanoski et al., 2016).

Outros trabalhos associam o abuso dos EAAs a efeitos colaterais psicogênicos, incluindo dependência química, comportamento agressivo e violento (Grimes et al., 2006; Cunningham et al., 2007). Entretanto, há poucos estudos associando o uso de EAAs à diminuição no número de corpos de neurônios (Damião et al., 2012).

O hipotálamo é um importante centro neuroendócrino e seus núcleos são fundamentais no controle da homeostasia (Bouret, 2013; Pearson e Placzek, 2013; Cornejo et al., 2016). Dentre os resultados do artigo 1 da presente tese, doses suprafisiológicas de Winstrol® e de Deposteron® reduziram significativamente a média total do número de células do Núcleo Arqueado (ARC) ao se comparar com o grupo Controle dos machos. Ainda que não tenha obtido o mesmo resultado para o Núcleo Paraventricular (PVN), devido às amplas projeções do ARC a outros núcleos hipotalâmicos, inclusive ao PVN (Sutton et al., 2016), podemos compreender as alterações advindas do uso abusivo de EAAs: variações nos hormônios tireoidianos (Kersey et al., 2012), retenção hídrica, sintomas cardiovasculares (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014; Pomara et al., 2015), alterações no perfil lipídico, redução da fertilidade e flutuações da libido (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014).

A estrutura envolvida com a análise do uso de EAAs no artigo 2 da presente tese foi o corpo amigdalóide, responsável pela regulação de comportamentos emocionais (Vann, 2013; Duvarci e Pare, 2014). Foram quantificados corpos de neurônios da Amígdala Basolateral (BLA) e da Amígdala Central (AC) de camundongos machos que receberam doses suprafisiológicas de Durateston® e Deca Durabolin®. Houve redução significativa do número médio de corpos de neurônios para os dois fármacos ao se comparar com o grupo Controle. Os aspectos farmacológicos dessas substâncias fornecem evidências sobre como ocorre a redução do número médio de neurônios e quais suas consequências na ansiedade, memória (Christian et al., 2013; Silberman e Winder, 2013) e agressividade (Adams e Moghaddam, 2000; Wommack e Delville, 2002; Pirnik e Kiss, 2005).

Além do corpo amigdalóide, outras regiões cerebrais estão envolvidas no controle dessas funções, inclusive o hipotálamo (Phan et al., 2002; de Gelder et al., 2004; Hoistad e Barbas, 2008; Sokolowski et al., 2016), destacando-se a Área Hipotalâmica Lateral, o Núcleo Ventromedial e o Núcleo Arqueado (Sokolowski et al., 2016). Embora este último seja mais relacionado ao metabolismo energético (Morton et al., 2006; Sternson, 2013; Sokolowski et al., 2016), também é implicado no acasalamento e em respostas ao estresse (Sokolowski et al., 2015; Sokolowski et al., 2016). O corpo amigdalóide e o hipotálamo estão de tal forma interligados que, em situações estressoras, ocorrem mudanças em todo o indivíduo. Um exemplo é a “resposta de luta ou fuga” em que a estimulação do corpo amigdalóide, em conjunto com outras áreas, desencadeia estímulos excitatórios que atingem o PVN, principal núcleo hipotalâmico controlador do sistema nervoso autônomo, provocando uma resposta fisiológica ao estresse ou à ameaça (Ferguson et al., 2008; Catterall, 2015; Galassi et al., 2016; Sutton et al., 2016).

As interações entre as estruturas pesquisadas também interferem na alimentação. As ações que controlam a ingestão de alimentos envolvem níveis de hormônios reguladores do apetite (leptina, insulina, grelina) que ativam neurônios do ARC (Yasrebi et al., 2016). A partir desse núcleo as projeções se conectam a áreas como o PVN e o corpo amigdalóide (Boghossian et al., 2010; Sutton et al., 2016). Embora seja de menor importância para o controle alimentar, o corpo amigdalóide parece estar envolvido nas características relacionadas ao tipo de macronutriente a ser ingerido, particularmente, lipídios (Boghossian et al., 2010; Parker e Bloom, 2012).

Ainda que os resultados do Artigo 1 apresentem significância somente nos machos, a redução do número médio de neurônios das áreas avaliadas indica que o uso de EAAs leva a consequências como a morte celular, corroborando com trabalhos que relatam a neurotoxicidade dessas substâncias (Orlando et al., 2007; Damião et al., 2012; Ma e Liu, 2015; Pomara et al., 2015). O uso de EAAs provoca modificações no sistema monoaminérgico, reduzindo os níveis de dopamina e serotonina centrais (Ambar e Chiavegatto, 2009; Ricci et al., 2012; Tucci et al., 2012). À medida que os níveis de serotonina retraem, ocorre o favorecimento da neurotransmissão glutamatérgica excitatória com liberação excessiva de glutamato, o que pode ocasionar um elevado influxo de Ca^{+2} no neurônio e morte celular (Sattler e Tymianski, 2000; Orlando et al., 2007; Araujo et al., 2010; Caraci et al., 2011; Wang et al., 2012).

Poucos estudos, até o presente momento, relacionam o uso de EAAs à diminuição no número de corpos de neurônios. A maioria dos trabalhos publicados está associada aos

efeitos colaterais psicogênicos de altas doses dessas substâncias, incluindo comportamento agressivo, violento e dependência química (Cunningham et al., 2007; Damião et al., 2012). A redução do número médio de neurônios das áreas avaliadas pode explicar as alterações comportamentais apresentadas pelos usuários que respondem exageradamente a situações estressoras (Sokolowski et al., 2016), inclusive chegando a cometer atos violentos (Klotz et al., 2007; Lundholm et al., 2010).

Essa redução também pode influenciar, ao menos em parte, o principal efeito estético esperado desses fármacos entre não atletas: mudança na composição corporal – redução de gordura e aumento da massa magra (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014). Entretanto, a perda de células do ARC também se relaciona aos muitos efeitos adversos dos EAAs, como mau funcionamento da tireoide (Kersey et al., 2012), retenção hídrica, alterações cardiovasculares e hipertensão (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014; Pomara et al., 2015), além das alterações no perfil lipídico, redução da fertilidade e flutuações da libido (Dotson e Brown, 2007; Kersey et al., 2012; Pope et al., 2014).

Para melhor elucidação dos efeitos que podem ser provocados pelo uso abusivo de EAAs sugerem-se mais pesquisas a fim de compreender exatamente o significado clínico da perda neuronal envolvida no hipotálamo e no corpo amigdalóide. Para essa análise, seriam necessários estudos com um período de exposição ao tratamento mais longo e com outros métodos, bioquímicos ou moleculares, a fim de avaliar as substâncias químicas envolvidas que podem ser sintetizadas e liberadas por indução da administração dos EAAs.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados e discutidos nos dois artigos, pode-se concluir que o uso de doses suprafisiológicas de Esteroides Androgênicos Anabolizantes:

1. Reduziu o número de corpos celulares de neurônios do Núcleo Arqueado em camundongos machos que receberam Winstrol® ou Deposteron®;
2. Não alterou o número de corpos celulares de neurônios do Núcleo Paraventricular em camundongos machos que receberam Winstrol® ou Deposteron®;
3. Não alterou o número de corpos celulares de neurônios dos Núcleos Arqueado e Paraventricular em camundongos fêmeas que receberam Winstrol® ou Deposteron®;
4. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de corpos celulares de neurônios dos Núcleos Arqueado e Paraventricular ao comparar machos e fêmeas que receberam Winstrol® ou Deposteron®;
5. Reduziu o número de corpos celulares de neurônios na Amígdala Basolateral e na Amígdala Central, em camundongos machos que receberam doses isoladas ou combinadas de Deca Durabolin® e Durateston®.

REFERÊNCIAS*

- Adams BW, Moghaddam B. Tactile stimulation activates dopamine release in the lateral septum. *Brain Res.* 2000; 858(1): 177-180.
- Alkemade A. Thyroid hormone and the developing hypothalamus. *Front Neuroanat.* 2015; 9: 15.
- 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 Behav.* 2009; 8(2): 161-173.
- Araujo IM, Carreira BP, Carvalho CM, Carvalho AP. Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity. *Neurochem Res.* 2010; 35(12): 1966-1969.
- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(11): 5108-5117.
- Boghossian S, Park M, York DA. Melanocortin activity in the amygdala controls appetite for dietary fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(2): R385-393.
- Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses.* 2016; 93: 150-153.
- Bouret SG. Organizational actions of metabolic hormones. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2013; 34(1): 18-26.
- Busardo FP, Frati P, Sanzo MD, Napoletano S, Pinchi E, Zaami S, et al. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(1): 122-131.
- Caraci F, Pistara V, Corsaro A, Tomasello F, Giuffrida ML, Sortino MA, et al. Neurotoxic properties of the anabolic androgenic steroids nandrolone and methandrostenolone in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res.* 2011; 89(4): 592-600.
- Carmichael CY, Wainford RD. Hypothalamic signaling mechanisms in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2015; 17(5): 39.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Catterall WA. Regulation of Cardiac Calcium Channels in the Fight-or-Flight Response. *Curr Mol Pharmacol*. 2015; 8(1): 12-21.

Chitravanshi VC, Kawabe K, Sapru HN. GABA and glycine receptors in the nucleus ambiguus mediate tachycardia elicited by chemical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(1): H174-184.

Christian DT, Alexander NJ, Diaz MR, McCool BA. Thalamic glutamatergic afferents into the rat basolateral amygdala exhibit increased presynaptic glutamate function following withdrawal from chronic intermittent ethanol. *Neuropharmacology*. 2013; 65: 134-142.

Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 2005; 8(5): 571-578.

Cornejo MP, Hentges ST, Maliqueo M, Coirini H, Becu-Villalobos D, Elias CF. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J Neuroendocrinol*. 2016; 28(7): 1-12.

Cunningham RL, Claiborne BJ, McGinnis MY. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience*. 2007; 150(3): 609-615.

Damião B, Souza GG, Nogueira DA, Rossi Junior WC, Fernandes GJM, Esteves A. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteroides Anabolizantes. *Rev Neurocienc*. 2012; 20(1): 68-72.

de Gelder B, Snyder J, Greve D, Gerard G, Hadjikhani N. Fear fosters flight: a mechanism for fear contagion when perceiving emotion expressed by a whole body. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(47): 16701-16706.

Dotson JL, Brown RT. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatr Clin North Am*. 2007; 54(4): 761-769.

Duvarci S, Pare D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*. 2014; 82(5): 966-980.

Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12(6): 717-727.

Galassi FM, Boni T, Ruhli FJ, Habicht ME. Fight-or-flight Response in the ancient Egyptian novel "Sinuhe" (c. 1800 BCE). *Auton Neurosci*. 2016; 195: 27-28.

- Grimes JM, Ricci LA, Melloni RH, Jr. Plasticity in anterior hypothalamic vasopressin correlates with aggression during anabolic-androgenic steroid withdrawal in hamsters. *Behav Neurosci*. 2006; 120(1): 115-124.
- Handelsman DJ, Heather A. Androgen abuse in sports. *Asian J Androl*. 2008; 10(3): 403-415.
- Hernandez-Lallement J, van Wingerden M, Schable S, Kalenscher T. Basolateral amygdala lesions abolish mutual reward preferences in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2016; 127: 1-9.
- Hoberman JM, Yesalis CE. The history of synthetic testosterone. *Sci Am*. 1995; 272(2): 76-81.
- Hoistad M, Barbas H. Sequence of information processing for emotions through pathways linking temporal and insular cortices with the amygdala. *Neuroimage*. 2008; 40(3): 1016-1033.
- Kahn A. Regaining lost youth: the controversial and colorful beginnings of hormone replacement therapy in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60(2): 142-147.
- Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG, Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction*. 2009; 104(12): 1966-1978.
- Kanayama G, Kean J, Hudson JI, Pope HG. Cognitive Deficits in Long-Term Anabolic-Androgenic Steroid Users. *Drug and alcohol dependence*. 2013; 130(0): 208-214.
- Kandel ER. *Principles of neural science*. New York, McGraw-Hill. 2013.
- Kersey RD, Elliot DL, Goldberg L, Kanayama G, Leone JE, Pavlovich M, et al. National athletic trainers' association position statement: Anabolic-androgenic steroids. *Journal of Athletic Training*. 2012; 47(5): 567-588.
- Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(3): 502-521.
- Klotz F, Petersson A, Isacson D, Thiblin I. Violent crime and substance abuse: a medico-legal comparison between deceased users of anabolic androgenic steroids and abusers of illicit drugs. *Forensic Sci Int*. 2007; 173(1): 57-63.
- Liao GY, Bouyer K, Kamitakahara A, Sahibzada N, Wang CH, Rutlin M, et al. Brain-derived neurotrophic factor is required for axonal growth of selective groups of neurons in the arcuate nucleus. *Mol Metab*. 2015; 4(6): 471-482.
- Liao GY, Li Y, Xu B. Ablation of TrkB expression in RGS9-2 cells leads to hyperphagic obesity. *Mol Metab*. 2013; 2(4): 491-497.

- Lozic M, Tasic T, Martin A, Greenwood M, Sarenac O, Hindmarch C, et al. Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. *Pharmacol Res.* 2016; 114: 185-195.
- Lundholm L, Kall K, Wallin S, Thiblin I. Use of anabolic androgenic steroids in substance abusers arrested for crime. *Drug Alcohol Depend.* 2010; 111(3): 222-226.
- Ma F, Liu D. 17beta-trenbolone, an anabolic-androgenic steroid as well as an environmental hormone, contributes to neurodegeneration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015; 282(1): 68-76.
- Maejima Y, Sakuma K, Santoso P, Gantulga D, Katsurada K, Ueta Y, et al. Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Lett.* 2014; 588(23): 4404-4412.
- Manojlovic-Stojanoski M, Nestorovic N, Trifunovic S, Ristic N, Jaric I, Filipovic B, et al. Dexamethasone exposure affects paraventricular nucleus and pituitary corticotrophs in female rat fetuses: An unbiased stereological and immunohistochemical study. *Tissue Cell.* 2016; 48(5): 516-523.
- McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 1998; 55(3): 257-332.
- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1): 1-28.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006; 443(7109): 289-295.
- Netter FH, Jones HR, Burns TM, Machado CAG. The Netter collection of medical illustrations. Volume 7, Nervous system. Part 1. Brain : a compilation of paintings. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier. 2013.
- Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain Research.* 2007; 1165: 21-29.
- Pape HC, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev.* 2010; 90(2): 419-463.
- Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 2012; 63(1): 18-30.

- Pearson CA, Placzek M. Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. *Curr Top Dev Biol.* 2013; 106: 49-88.
- Phan KL, Wager T, Taylor SF, Liberzon I. Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage.* 2002; 16(2): 331-348.
- Pirnik Z, Kiss A. Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull.* 2005; 65(5): 423-431.
- Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. *Curr Neuroparmacol.* 2015; 13(1): 132-145.
- Pope HG, Jr., Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2014; 35(3): 341-375.
- Ricci LA, Morrison TR, Melloni RH, Jr. Serotonin modulates anxiety-like behaviors during withdrawal from adolescent anabolic-androgenic steroid exposure in Syrian hamsters. *Horm Behav.* 2012; 62(5): 569-578.
- Rocha M, Aguiar F, Ramos H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 2014; 9(2): 98-105.
- Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl).* 2000; 78(1): 3-13.
- Silberman Y, Winder DG. Corticotropin releasing factor and catecholamines enhance glutamatergic neurotransmission in the lateral subdivision of the central amygdala. *Neuropharmacology.* 2013; 70: 316-323.
- Sokolowski K, Esumi S, Hirata T, Kamal Y, Tran T, Lam A, et al. Specification of select hypothalamic circuits and innate behaviors by the embryonic patterning gene *dbx1*. *Neuron.* 2015; 86(2): 403-416.
- Sokolowski K, Tran T, Esumi S, Kamal Y, Oboti L, Lischinsky J, et al. Molecular and behavioral profiling of *Dbx1*-derived neurons in the arcuate, lateral and ventromedial hypothalamic nuclei. *Neural Dev.* 2016; 11(1): 1-17.

- Standring S, Gray HA. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. Edinburgh, Churchill Livingstone. 2008.
- Sternson SM. Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron*. 2013; 77(5): 810-824.
- Sutton AK, Myers MG, Jr., Olson DP. The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol*. 2016; 78: 207-221.
- Tucci P, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, Cuomo V, et al. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. *Steroids*. 2012; 77(3): 269-275.
- Vann SD. Dismantling the Papez circuit for memory in rats. *Elife*. 2013; 2: 1-21
- Wang Y, Zyskind JW, Colacurcio DJ, Lindl KA, Ting JH, Grigoriev G, et al. Differential roles for caspase-mediated and calpain-mediated cell death in 1- and 3-week-old rat cortical cultures. *Neuroreport*. 2012; 23(18): 1052-1058.
- Wassum KM, Izquierdo A. The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 57: 271-283.
- Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci*. 2012; 15(10): 1350-1355.
- Williams LM, Das P, Liddell BJ, Kemp AH, Rennie CJ, Gordon E. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. *J Neurosci*. 2006; 26(36): 9264-9271.
- Wommack JC, Delville Y. Chronic social stress during puberty enhances tyrosine hydroxylase immunoreactivity within the limbic system in golden hamsters. *Brain Res*. 2002; 933(2): 139-143.
- Yasrebi A, Hsieh A, Mamounis KJ, Krumm EA, Yang JA, Magby J, et al. Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17beta-estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 422: 42-56.

APÊNDICE 1 - Versão em português do item 2.1

Análise dos Efeitos Quantitativos de Doses Suprafisiológicas de Esteroides Androgênicos Anabolizantes em neurônios dos Núcleos Arqueado e Paraventricular do Hipotálamo de Camundongos

Valério Landim de Almeida^{1*}, Alessandra Esteves², Wagner Costa Rossi Junior², Bruno Damião² e Fausto Berzin¹

¹*Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil*

²*Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, Brasil.*

Resumo: Os Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs) são sintetizados a partir da testosterona. Seu uso irregular, sem indicação médica, começou a crescer entre a população a partir da década de 1980. Embora existam trabalhos alertando sobre os efeitos deletérios desses fármacos, ainda são muito consumidos entre os jovens que desejam uma aparência magra e musculosa ou para promover o alívio da fadiga e melhora do desempenho físico. Entretanto, há evidências sobre seu potencial neurodegenerativo. **Objetivo:** Avaliar os efeitos quantitativos em corpos celulares de neurônios dos núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo de camundongos que receberam doses suprafisiológicas de EAAs. **Métodos:** Foram utilizados 60 camundongos da linhagem Swiss, divididos em 3 grupos (n=20, com 10 machos e 10 fêmeas): G1, em que foi administrado Deposteron® (cipionato de testosterona); G2, em que foi administrado Winstrol® (stanozolol); e G3, Controle, recebeu solução fisiológica. Os animais foram tratados por 30 dias com a administração dos fármacos e a prática de natação. Para a análise quantitativa de corpos celulares de neurônios, empregou-se uma técnica de estereologia. **Resultados:** Houve redução significativa no número de neurônios do ARC para os machos tratados com Deposteron (p=0,0489) e Winstrol (p=0,0004) em relação ao grupo Controle. Não houve resultado significativo para o PVN de machos nem para o ARC e o PVN nas fêmeas. **Conclusão:** Administração de doses suprafisiológicas de EAAs provoca redução do número de neurônios nos camundongos machos no núcleo arqueado do hipotálamo.

Palavras-chave: Esteroides; Núcleo Arqueado do Hipotálamo; Núcleo Hipotalâmico Paraventricular; Hipotálamo; Estanozolol; Testosterona; Camundongos.

*Para se corresponder com o autor: Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo. Endereço: Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba, São Paulo, Brasil. CEP: 13414-018. Tel/Fax: +55-19-2106-5200; Email: valerioalmeida@msn.com

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs)

Hormônios são compostos produzidos pelo sistema endócrino que, ao atingirem os órgãos-alvo, regulam quimicamente funções corporais específicas, interferindo nas atividades celulares. Uma das classificações é o grupo dos esteroides, que apresenta uma estrutura química formada por quatro anéis de carbono. Esses hormônios têm o colesterol como precursor e são produzidos pelas gônadas, córtex da suprarrenal e pelos metabólitos ativos da vitamina D [1, 2].

Dentre os hormônios sexuais, existem a progesterona e o estrogênio secretados nos ovários e a testosterona, nos testículos. A testosterona é androgênica e anabólica, relacionando-se tanto a características masculinizantes quanto ao desenvolvimento tecidual [2]. Dessarte, a testosterona é um Esteroide Androgênico Anabolizante (EAA) e suas ações atingem vários tecidos além do muscular e esquelético, incluindo o reprodutor, hepático, renal, hematopoiético e nervoso [1].

O grupo de EAAs abrange uma família de hormônios lipofílicos derivados do colesterol que inclui o hormônio natural masculino, testosterona, juntamente com seus derivados sintéticos [3-5]. Atletas olímpicos, na Grécia antiga, já usavam uma variedade de poções, plantas e extratos de origem animal para potencializar o desempenho nos esportes [6]. No século XIX houve uma série de experimentos que tinham como objetivos o rejuvenescimento, aumento de força e condicionamento físico [1, 7, 8].

Em 1935, a testosterona foi quimicamente isolada e, em seguida, sinteticamente desenvolvida a partir do colesterol [1, 8]. O uso clínico de EAAs se estendeu, a partir da década de 1940, nas terapias de reposição hormonal, no tratamento de doenças crônicas debilitantes, anemias, queimaduras, uso em alguns tipos de trauma, cirurgias e na terapêutica para controle da depressão, da melancolia e de alguns tipos de câncer [1, 8, 9].

Embora sejam substâncias controladas em vários países, inclusive nos Estados Unidos e no Brasil, os EAAs para fins não medicinais são comercializados ilegalmente, inclusive pela internet e nas próprias academias [8]. Começaram a ser adquiridos pela população na década de 1980 e tornaram-se amplamente utilizados, especialmente entre os jovens que desejam uma aparência magra e musculosa ou ainda para promover o alívio da fadiga e a melhora do desempenho físico, mesmo durante atividades recreativas entre não atletas [1, 4, 9, 10].

1.2 Hipotálamo: Núcleos Arqueado e Paraventricular

O hipotálamo é uma pequena área diencefálica bilateral, próxima ao terceiro ventrículo que possui uma ampla coleção de grupos celulares dispostos em núcleos [11]. Influenciado por sinais que carregam informações sobre os estados nutricionais e metabólicos, seus circuitos têm um papel essencial na homeostasia, assegurando que as respostas fisiológicas estejam em sintonia com as exigências ambientais [12]. A regulação homeostática do balanço energético depende da atividade dos circuitos neurais do hipotálamo, em especial relacionados ao Núcleo Arqueado (ARC) [13, 14], localizado bilateralmente próximo à região inferior do terceiro ventrículo [15-18].

O ARC é responsivo a uma variedade de hormônios e nutrientes, incluindo leptina, insulina, grelina, esteroides sexuais e glicose [12, 14-16, 18,19]. Seus neurônios se projetam a outras regiões implicadas no controle da alimentação, como o Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo, a Área Hipotalâmica Lateral e o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) [12, 16]. Para que haja resposta às demandas energéticas de um animal são particularmente relevantes as projeções do ARC para o PVN [14, 20-22].

Lesões nas células do PVN, aferentes em relação ao ARC, revelam a importância desse núcleo, uma vez que resultam em obesidade hiperfágica, enquanto que a ativação dessas células promove aumento do gasto energético e redução da ingestão alimentar [14]. O PVN exerce a função de um centro integrador do controle neuroendócrino e autonômico [23] atuando em outras funções importantes como produção de leite, contração uterina e o controle do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal pela vasopressina e pelo hormônio liberador de corticotropina, o que envolve equilíbrio hídrico, controle cardiovascular [17, 23, 24] e dos hormônios tireoidianos [25].

Ao observar o consumo indiscriminado dos EAAs e tendo em vista a relevância fisiológica do ARC e do PVN na integração de respostas essenciais à homeostase e ao equilíbrio energético, achamos por bem estudar quais os efeitos de doses supra fisiológicas de duas dessas substâncias nos neurônios de camundongos uma vez que há semelhanças estruturais com o encéfalo do ser humano.

Os objetivos do trabalho incluem avaliar quantitativamente os corpos celulares de neurônios nos Núcleos Paraventricular (PVN) e Arqueado (ARC) do hipotálamo de camundongos sob o uso de doses supra fisiológicas de Deposteron® (cipionato de testosterona) e Winstrol Depot® (estanozolol) e comparar os dados acima descritos entre machos e fêmeas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 camundongos da linhagem Swiss, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL- MG), sendo 30 machos e 30 fêmeas. Os animais tinham 90 dias de idade (jovens adultos) e peso corporal entre 40 e 50 gramas. Foram alojados em caixas contendo 5 animais cada, tratados com ração comercial, água *ad libitum* e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro.

3. EXPERIMENTO

O tratamento farmacológico consistiu na aplicação intraperitoneal [26-28] dos esteroides anabolizantes: Deposteron® (cipionato de Testosterona) do laboratório EMS Sigma Pharma e Winstrol Depot® (estanozolol) do laboratório Landerlan. As doses [29, 30] estão descritas na Tabela 1. Os esteroides foram aplicados no mesmo horário, duas vezes por semana (as terças e quintas-feiras), durante 30 dias. Nos grupos Controle foi administrada solução fisiológica em mesmo volume que as aplicações dos demais grupos [28] (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos de animais conforme substância injetada e dosagem.

Grupos	Animais		Substância injetada	Dosagem	Treinamento
	Machos	Fêmeas			
Deposteron	10	10	Deposteron® (cipionato de Testosterona)	0,8mg/kg	Natação
Winstrol	10	10	Winstrol Depot® (estanozolol)	1,8mg/kg	Natação
Controle	10	10	(Solução fisiológica 0,9%)	0,04 ml/aplicação	Natação

Três vezes por semana, nos dias que intercalaram as aplicações dos EAAs (segundas, quartas e sextas-feiras), os animais foram submetidos à natação por 5 (cinco) minutos em um recipiente de plástico medindo 43x34x26cm contendo água à temperatura de 24-26°C e a uma altura suficiente para que não conseguissem sair do recipiente nem se apoiar em seu fundo [28].

Decorridos os 30 dias, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano para posterior craniotomia. Os encéfalos foram removidos inteiramente, lavados em solução fisiológica e fixados em recipientes de vidro, contendo paraformaldeído a 4% em tampão fosfato. O material de cada animal foi identificado e permaneceu imerso nessa solução fixadora por vinte e quatro horas [31]. Após esse período, procedeu-se a sequência padronizada nos processamentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

De cada encéfalo foram retiradas amostras seriadas e homotípicas em cortes frontais [32-34] com espessura de 7 μ m em micrótomo *Yidi YD-315*. Para avaliar as áreas estabelecidas para o estudo [35], o material foi corado com violeta cresil [33, 36]. Essa técnica permite a visualização dos corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios, o que possibilita marcar forte e individualmente cada célula para posterior contagem em microscopia óptica [34, 36, 37].

Para a análise quantitativa de corpos celulares de neurônios, empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples [38-40]. A determinação das áreas estudadas confere com a representação das imagens 37 e 44 do atlas de estereotaxia de Franklin e Paxinos [35]: o Núcleo Paraventricular (PVN) se encontrava em um plano no qual era possível visualizar o Núcleo Supraquiasmático; e o Núcleo Arqueado (ARC) se encontrava em um plano na qual era possível visualizar o Núcleo Dorsomedial.

Cada núcleo teve duas áreas quantificadas por hemisfério, totalizando 4 áreas por corte. Para evitar a contagem da mesma célula mais de uma vez, foram analisados 3 cortes semi-seriados por animal, totalizando 12 campos histológicos por núcleo estudado para cada espécime. Como foram quantificados dois núcleos (PVN e ARC), obteve-se um total de 24 áreas por animal. Assim, para a amostra utilizada, foi quantificado o total de 1440 áreas em um aumento de 400 vezes (Figura 1).

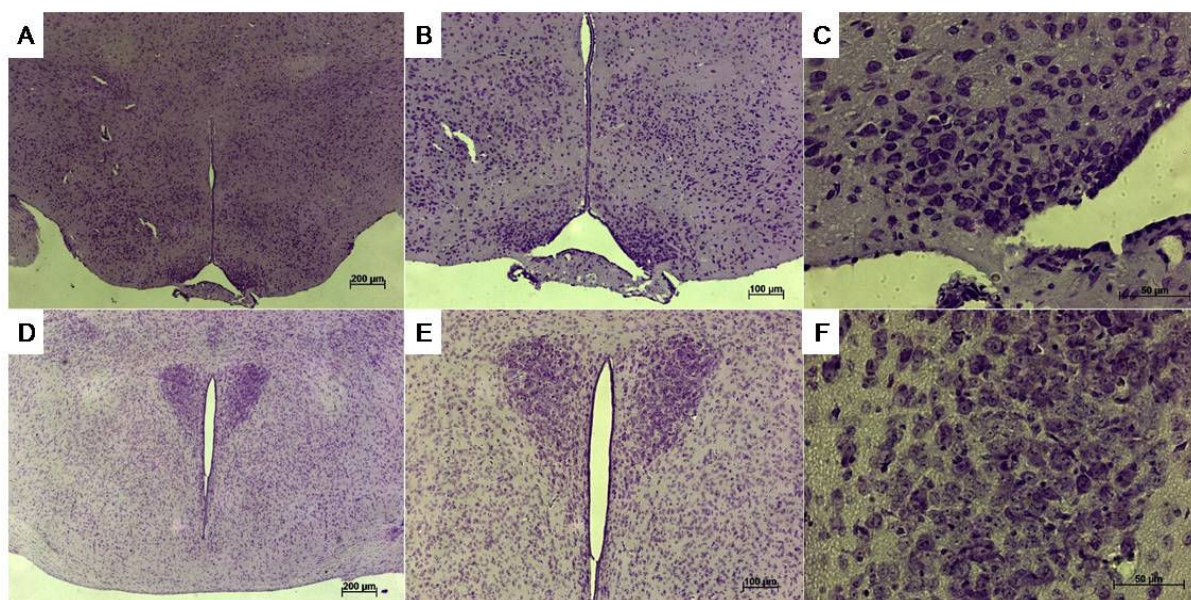


Figura 1 – Fotomicrografia em aumento gradual de corte frontal de cérebro de camundongo para ilustrar o método utilizado: Os maiores adensamentos de neurônios da parte superior da imagem (A-C) pertencem ao ARC. Os maiores adensamentos da parte inferior da imagem (D-F) pertencem ao PVN. A análise quantitativa foi realizada no aumento de 400x, visível em C e em F. Imagem do autor.

A contagem foi feita com auxílio de uma área teste (*counting frame*), medindo 120,75 cm². Foram quantificados os corpos celulares que apresentavam nucléolo, dispostos dentro da área teste e na linha de inclusão (tracejada em verde). Foram excluídas as células nas linhas contínuas em vermelho [28, 32, 38] (Figura 2). Todas as análises foram feitas em um computador com o Sistema Analisador de Imagens *Axiovision4 Module Interactive Measurement*, acoplado ao microscópio *AxioScope A1* da Carl Zeiss®.

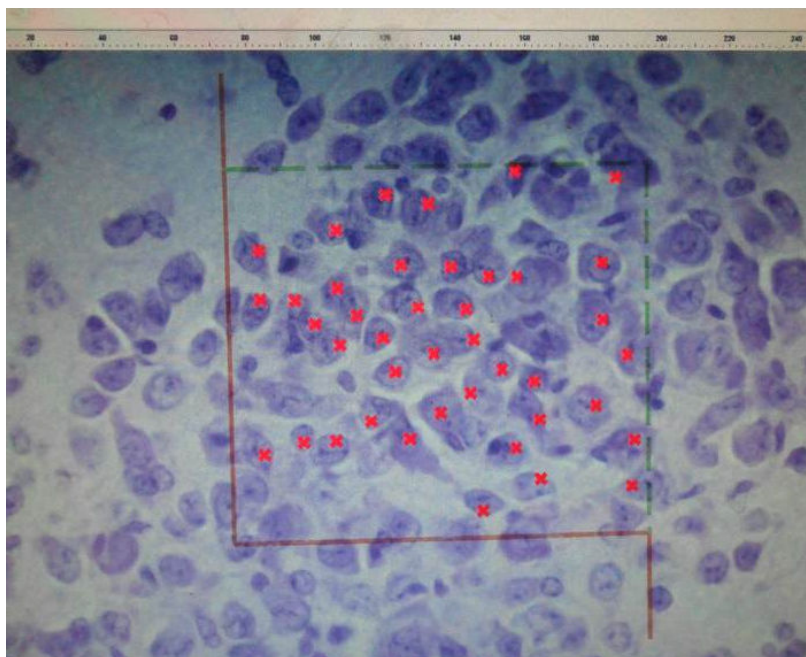


Figura 2 – A área teste utilizada (*counting frame*). Foram quantificadas somente células inseridas no quadrante ou na linha tracejada, excluindo-se as que tocassem a linha contínua. Imagem do autor.

A análise estatística foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA) com esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Utilizou-se o sistema estatístico R [41] com o pacote ExpDes.pt [42] e, para todas as análises, foi adotado o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparação entre os machos

Na Figura 3-A, observa-se o comparativo da quantificação neuronal nos diferentes grupos entre os núcleos avaliados nos animais machos (médias e desvio-padrão). Para o grupo

Controle houve diferença significativa ($p = 0,042$) entre as médias de corpos de neurônios ao se comparar o ARC ($41,49 \pm 13,9$) em relação ao PVN ($35,21 \pm 9,89$). O tratamento com Deposteron® também gerou redução na quantificação neuronal ($p = 0,0489$) do ARC ($25,81 \pm 6,15$) em relação ao PVN ($31,76 \pm 9,7$). Contudo, no tratamento com Winstrol Depot®, não se observou diferença estatística entre os núcleos.

A análise neuronal do ARC nos machos (Figura 3-B) apresenta uma redução significativa de células nervosas ($p = 0,0004$) quando se compara o grupo Controle ($41,49 \pm 13,9$) com os animais tratados tanto com Deposteron® ($25,81 \pm 6,15$) quanto com Winstrol Depot® ($22,66 \pm 6,9$), sendo os grupos tratados estatisticamente iguais. Contudo, a média do número de neurônios do PVN para os machos não apresenta diferença estatística ao se comparar os diversos grupos (Figura 3-B).

Na comparação do grupo controle entre os machos (Figura 3-A), observa-se maior número de neurônios para o Núcleo Arqueado (ARC) em relação ao Núcleo Paraventricular (PVN). Embora o ARC geralmente se apresente em menor volume do que o PVN, suas células também são menores, ao passo que o PVN possui divisões conforme tamanho celular e função [14] - magnocelulares e parvocelulares [19, 36]. A análise estereológica utilizada explica essa diferença entre as populações celulares: quanto maior a célula, menos unidades cabem no retículo, [38-40], tornando o ARC mais populoso que o PVN.

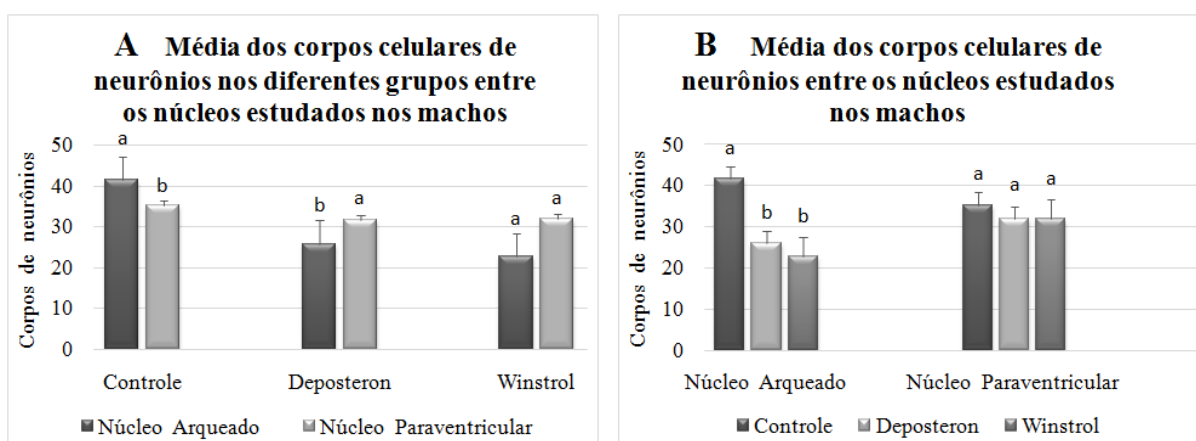


Figura 3 – Gráfico A: Comparação do número médio de neurônios nos diferentes grupos entre os núcleos estudados nos machos e respectivos desvios-padrão. Gráfico B: Comparação do número médio de neurônios dos núcleos entre os grupos nos machos e respectivos desvios-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey.

Dentre os Esteroides Androgênicos Anabolizantes (EAAs) usados no trabalho, o Deposteron® é bastante lipossolúvel, inclusive se encontra em meio oleoso, diferentemente

do Wintrol Depot®, cujo veículo é aquoso, fato que dificultaria a travessia da barreira hematoencefálica deste último [28]. Como ambos apresentaram efeitos estatisticamente iguais no ARC (Figura 3-B), podemos inferir que a ação dos EAAs no ARC pode ser exacerbada pela proximidade do núcleo com um dos órgãos circunventriculares: a eminência mediana. O ARC é adjacente a essa estrutura, região livre de barreira hematoencefálica que permite maior liberdade de fluxo de substâncias pelos capilares fenestrados [13, 14, 17]. Essa proximidade pode tornar a região um alvo neuronal mais suscetível que o PVN conforme se observa na Figura 3-B.

Outro fator já descrito é a heterogeneidade na população celular do PVN [19, 36] que pode reagir de modo diverso a essas substâncias conforme os receptores nucleares de suas células o que diminuiria os efeitos diretos nesse núcleo hipotalâmico. Embora não haja alterações significativas na quantificação neuronal do PVN, é imprudente afirmar que os EAAs não exerçam ação nessa estrutura, visto que muitas das aferências que chegam ao núcleo partem do ARC [12, 16, 22].

4.2 Comparação entre as fêmeas

Para o nível de significância adotado, os resultados indicam que não houve alteração referente à quantidade média de corpos celulares de neurônios nos núcleos ARC e PVN de fêmeas para os grupos avaliados (Figura 4-A). Resultado semelhante foi obtido ao se comparar os diferentes grupos para cada núcleo, ARC e PVN. (Figura 4-B).

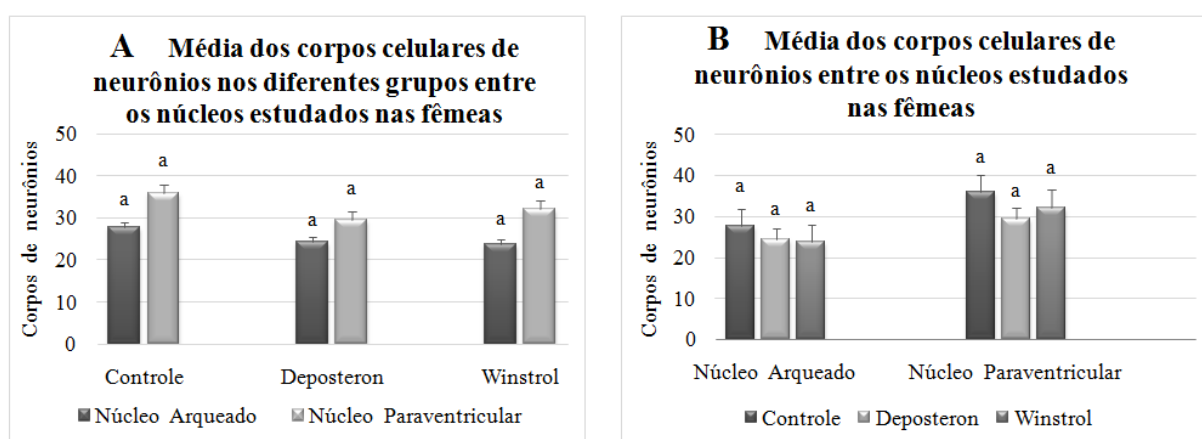


Figura 4 – Gráfico A: Comparação do número médio de neurônios nos diferentes grupos entre os núcleos estudados nas fêmeas e respectivos desvios-padrão. Gráfico B: Comparação do número médio de neurônios dos núcleos entre os grupos nas fêmeas e respectivos desvios-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey.

Diferentemente das fêmeas (Figura 4-B), os machos sofreram perdas celulares significativas no ARC (Figura 3-B). Um importante fator a considerar é a presença da testosterona endógena em níveis mais elevados nos machos [1, 43]. Trabalhando com camundongos, Ribeiro et al., 2014 citam que os EAAs podem modular os receptores hormonais nucleares e provocar alterações mais significativas nos machos, pois o nível da testosterona circulante continua maior que nas fêmeas [28]. Na literatura, encontramos registro do potencial neurotóxico da testosterona e do estanozolol, princípio ativo do Winstrol Depot® usado neste experimento [4]. Orlando et al., 2007 constataram que o estanozolol intensificou a morte de neurônios induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA) [44]. Esses trabalhos sugerem ações nocivas desses compostos nos neurônios e vêm ao encontro dos nossos resultados. Corroboram outros estudos em que foram avaliados efeitos de EAAs em neurônios do córtex cerebral de ratos [32], em hipocampo de ratos [45] e em células de purkinje do cerebelo de camundongos [28]. Também há trabalhos em que foi observada a redução da densidade dendrítica da medula espinal [46], confirmando a neurotoxicidade dos EAAs [4].

A ausência de efeitos significativos nas fêmeas pode ser explicada pelo fator de neuroproteção dos hormônios femininos endógenos. O esteroide 17 β -estradiol (E2) regula muitos aspectos da homeostase por meio de mecanismos centrais via receptor de esteroide nuclear ER α , que é altamente expresso no ARC [19, 47]. Alguns trabalhos relacionam a proteção do estradiol contra o excesso de glutamato (potencialmente neurotóxico) em acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e em hipóxia [6, 48, 49]. Também há relato de proteção neuronal contra a morte celular induzida pelo glutamato em neurônios hipocámpais de porquinhos da índia [50].

4.3 Comparação entre machos e fêmeas

Os resultados fornecem um quadro da quantificação de corpos celulares de neurônios entre machos e fêmeas de acordo com o grupo e áreas estudadas. A Figura 5-A revela que para o Núcleo Arqueado (ARC), ao se comparar animais machos e fêmeas do grupo Controle, houve diferença significativa ($p = 0,005$), sendo a média de corpos de neurônios dos machos ($41,49 \pm 13,9$) maior que das fêmeas ($27,78 \pm 6,06$). Para os grupos que receberam EAAs não houve alteração significativa na quantificação.

Em relação aos neurônios do Núcleo Paraventricular (PVN) não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar machos e fêmeas entre os diferentes grupos (Figura 5-B).

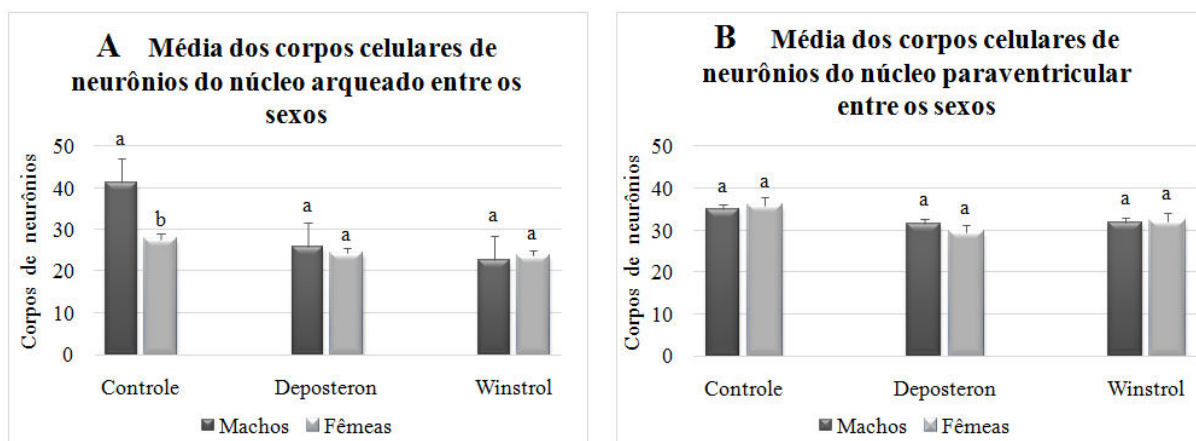


Figura 5 – Comparação do número médio de neurônios nos diferentes grupos entre os sexos para o núcleo arqueado (Gráfico A) e para o núcleo paraventricular (Gráfico B) e respectivos desvios-padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey.

Na comparação geral entre machos e fêmeas, observa-se dimorfismo no grupo Controle para o ARC de modo que esse núcleo nas fêmeas possui um número menor de células que nos machos (Figura 5-A). Um detalhado estudo com ratos encontrou resultado semelhante, contudo a fêmea apresentou mais células que o macho no PVN [51], resultado diferente do presente trabalho (Figura 5-B). Um estudo clássico em humanos não encontrou diferença estatística entre os sexos ao avaliar volume do núcleo, diâmetro médio, densidade celular e número total de células [34]. Trabalhos atuais comparam grupos específicos de neurônios entre os sexos [19, 52], neurotransmissores ou receptores [47, 53], mas não trazem informações sobre diferenças na quantificação neuronal total.

O maior número de células encontrado no ARC dos machos Controle (Figura 5-A) também pode ser explicado pela relação do núcleo com os esteroides sexuais. Equilíbrio energético e composição corporal mediados pelo ARC são influenciados pelos esteroides sexuais, portanto há dimorfismo entre os núcleos conforme o sexo para a espécie humana e para modelos animais [13, 52].

É importante ressaltar a atuação do ARC para o metabolismo visto que age na integração de sinais periféricos e centrais para controle da homeostase. Sob o comando de hormônios reguladores do apetite (leptina, insulina e grelina) pode ativar grupos de neurônios controladores da ingestão de alimentos [19]. Como a leptina é produzida pelo tecido adiposo branco em proporção aproximada às reservas de triglicérides, fornece ao hipotálamo condições para o controle do gasto energético e da termogênese. A partir do ARC, as projeções seguem suas vias, inclusive para o PVN [14]. Além dessas funções, também

podemos citar a ativação autonômica da atividade cardiovascular após estimulação do ARC que é mediada por projeções do PVN [17, 23], assim como o controle dos hormônios tireoidianos [25], corticosteroides suprarrenais [24] e balanço hídrico [23].

Embora os resultados sejam significativos somente nos machos (Figura 3-B x Figura 4-B), indicam que o uso abusivo dos EAAs leva a consequências como a morte celular de neurônios do ARC, o que pode influenciar, ao menos em parte, no principal efeito estético esperado desses fármacos entre não atletas: mudança na composição corporal – redução de gordura e aumento da massa magra [1, 6, 8]. Entretanto, a perda de células do ARC poderia também se relacionar aos muitos efeitos adversos dos EAAs, como malfuncionamento da tireoide [1], retenção hídrica, alterações cardiovasculares e hipertensão [1, 4, 6, 8], além das alterações no perfil lipídico, redução da fertilidade e flutuações da libido [1, 6, 8].

Para melhor elucidação dos efeitos que podem ser provocados pelo uso abusivo de EAAs faz-se necessário a realização de outras pesquisas a fim de compreender o quanto esses fármacos são capazes de influenciar as conexões que envolvem ARC e PVN. Para essa análise seriam necessários estudos com um período de exposição ao tratamento mais longo e com outros métodos, bioquímicos ou moleculares, a fim de avaliar as substâncias químicas envolvidas que podem ser sintetizadas e liberadas por indução da administração dos EAAs.

5. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que nos animais machos houve redução de corpos celulares do Núcleo Arqueado para ambas as substâncias; entretanto, não houve diferença estatística em relação ao Núcleo Paraventricular na comparação entre os grupos tratados com o Controle. Em comparação com o grupo Controle, as fêmeas não apresentaram diferença significativa na quantificação de neurônios para nenhum dos núcleos, independentemente do fármaco envolvido. Também não houve diferença estatisticamente significativa no número de corpos celulares de neurônios dos Núcleos Arqueado e Paraventricular ao comparar machos e fêmeas que receberam Winstrol® ou Deposteron®.

PROTOCOLO NORMATIVO RELATIVO ÀS HOMOLOGAÇÕES, REGISTROS E PROTEÇÃO ANIMAL

O experimento está em conformidade com os princípios éticos, tendo sido apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UNIFAL-MG) sob registro nº 414/2012.

Os autores também confirmam que todos os procedimentos seguidos na pesquisa estavam de acordo com os padrões estabelecidos na oitava edição do “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” (grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals_prepub.pdf), publicado pela Academia Nacional de Ciências, The National Academies Press, Washington, DC).

CONFLITO DE INTERESSES

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) do Governo do Brasil.

Os autores assumem que não há nada mais a declarar.

REFERÊNCIAS

1. Kersey RD, Elliot DL, Goldberg L, Kanayama G, Leone JE, Pavlovich M, *et al.* National athletic trainers' association position statement: Anabolic-androgenic steroids. *J Athl Train.* 2012;47(5):567-88.
2. Rocha M, Aguiar F, Ramos H. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.* 2014;9(2):98-105.
3. Kanayama G, Brower KJ, Wood RI, Hudson JI, Pope HG, Jr. Anabolic-androgenic steroid dependence: an emerging disorder. *Addiction.* 2009;104(12):1966-78.
4. Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review. *Curr Neuroparmacol.* 2015;13(1):132-45.
5. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses.* 2016;93:150-3.
6. Pope HG, Jr., Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews.* 2014;35(3):341-75.
7. Kahn A. Regaining lost youth: the controversial and colorful beginnings of hormone replacement therapy in aging. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2005;60(2):142-7.
8. Dotson JL, Brown RT. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatric clinics of North America.* 2007;54(4):761-9, xi.
9. Busardo FP, Frati P, Sanzo MD, Napoletano S, Pinchi E, Zaami S, *et al.* The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuroparmacol.* 2015;13(1):122-31.
10. Tucci P, Morgese MG, Colaianna M, Zotti M, Schiavone S, Cuomo V, *et al.* Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. *Steroids.* 2012;77(3):269-75.
11. Liao GY, Li Y, Xu B. Ablation of TrkB expression in RGS9-2 cells leads to hyperphagic obesity. *Molecular metabolism.* 2013;2(4):491-7.
12. Bouret SG. Organizational actions of metabolic hormones. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2013;34(1):18-26.

13. Cornejo MP, Hentges ST, Maliqueo M, Coirini H, Becu-Villalobos D, Elias CF. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(7).
14. Sutton AK, Myers MG, Jr., Olson DP. The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:207-21.
15. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature neuroscience.* 2012;15(10):1350-5.
16. Liao GY, Bouyer K, Kamitakahara A, Sahibzada N, Wang CH, Rutlin M, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is required for axonal growth of selective groups of neurons in the arcuate nucleus. *Molecular metabolism.* 2015;4(6):471-82.
17. Chitravanshi VC, Kawabe K, Sapru HN. GABA and glycine receptors in the nucleus ambiguus mediate tachycardia elicited by chemical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(1):H174-84.
18. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience.* 2005;8(5):571-8.
19. Yasrebi A, Hsieh A, Mamounis KJ, Krumm EA, Yang JA, Magby J, *et al.* Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17beta-estradiol. *Molecular and cellular endocrinology.* 2016;422:42-56.
20. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(6):717-27.
21. Maejima Y, Sakuma K, Santoso P, Gantulga D, Katsurada K, Ueta Y, *et al.* Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Lett.* 2014;588(23):4404-12.
22. Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 2012;63(1):18-30.
23. Lozic M, Tasic T, Martin A, Greenwood M, Sarenac O, Hindmarch C, *et al.* Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. *Pharmacol Res.* 2016;114:185-95.
24. Manojlovic-Stojanoski M, Nestorovic N, Trifunovic S, Ristic N, Jaric I, Filipovic B, *et al.* Dexamethasone exposure affects paraventricular nucleus and pituitary corticotrophs in female rat fetuses: An unbiased stereological and immunohistochemical study. *Tissue Cell.* 2016;48(5):516-23.
25. Alkemade A. Thyroid hormone and the developing hypothalamus. *Front Neuroanat.* 2015;9:15.
26. Costine BA, Oberlander JG, Davis MC, Penatti CA, Porter DM, Leaton RN, *et al.* Chronic anabolic androgenic steroid exposure alters corticotropin releasing factor expression and anxiety-like behaviors in the female mouse. *Psychoneuroendocrinology.* 2010;35(10):1473-85.
27. Penatti CA, Porter DM, Henderson LP. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. *J Neurosci.* 2009;29(40):12484-96.
28. Ribeiro CM, Silva DK, Damião B, Alves DM, Freitas AC, Rossi Junior WC, *et al.* Análise quantitativa de células de Purkinje em camundongos sob o uso dos esteroides anabolizantes. *Rev Neurocienc.* 2014;22(3):432-7.
29. Wood RI. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(4):490-506.
30. Inamdar Doddamani LS, Jayamma Y. Acceleration of neutrophil precursors' maturation and immunostimulation of CD3+, CD4+ lymphocytes by stanozolol in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012;129(3-5):172-8.

31. Rabinowicz T, Petetot JM-C, Khoury JC, de Courten-Myers GM. Neocortical maturation during adolescence: Change in neuronal soma dimension. *Brain and Cognition*. 2009;69(2):328-36.
32. Damião B, Souza GG, Nogueira DA, Rossi Junior WC, Fernandes GJM, Esteves A. Quantificação de Corpos de Neurônios em Camundongos Submetidos ao Uso de Esteroides Anabolizantes. *Rev Neurocienc*. 2012;20(1):68-72.
33. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016;524(18):3865-95.
34. Hofman MA, Fliers E, Goudsmit E, Swaab DF. Morphometric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes. *Journal of Anatomy*. 1988;160:127-43.
35. Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates. Third edition. ed. New York: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2007. 1 volume (unpaged) p.
36. Kádár A, Sánchez E, Wittmann G, Singru PS, Füzesi T, Marsili A, *et al*. Distribution of Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Mouse. *The Journal of comparative neurology*. 2010;518(19):3948-61.
37. Garcia-Cabezas MA, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat*. 2016;10:107.
38. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75(4):469-86.
39. Muhlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W. An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2010;108(5):1402-9.
40. Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology*. 2010;38(7):1011-25.
41. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
42. Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. ExpDes.pt: Experimental Designs Pacakge (Portuguese). R package version 1.1.2 ed2013.
43. Boff S. Esteroides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. *R bras Ci e Mov*. 2010;18(1):81-8.
44. Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, *et al*. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain research*. 2007;1165:21-9.
45. Ma F, Liu D. 17beta-trenbolone, an anabolic-androgenic steroid as well as an environmental hormone, contributes to neurodegeneration. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;282(1):68-76.
46. Wallin-Miller K, Li G, Kelishani D, Wood RI. Anabolic-androgenic steroids decrease dendritic spine density in the nucleus accumbens of male rats. *Neuroscience*. 2016;330:72-8.
47. Brock O, De Mees C, Bakker J. Hypothalamic expression of oestrogen receptor alpha and androgen receptor is sex-, age- and region-dependent in mice. *J Neuroendocrinol*. 2015;27(4):264-76.
48. Nunez J. Sex and steroid hormones in early brain injury. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012;13(3):173-86.

49. Siddiqui AN, Siddiqui N, Khan RA, Kalam A, Jabir NR, Kamal MA, *et al.* Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(5):342-50.
50. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 2008;88(1):91-124.
51. Lin KH, Peng YM, Peng MT, Tseng TM. Changes in the nuclear volume of rat hypothalamic neurons in old age. *Neuroendocrinology.* 1976;21(3):247-54.
52. Burke LK, Doslikova B, D'Agostino G, Greenwald-Yarnell M, Georgescu T, Chianese R, *et al.* Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons. *Molecular metabolism.* 2016;5(3):245-52.
53. Zuloaga DG, Zuloaga KL, Hinds LR, Carbone DL, Handa RJ. Estrogen receptor beta expression in the mouse forebrain: age and sex differences. *J Comp Neurol.* 2014;522(2):358-71.

ANEXOS

Anexo 1 – Confirmação da submissão do item 2.1 à publicação


Bentham Science Publishers

[HOME](#)
[ABOUT](#)
[USER HOME](#)
[CURRENT](#)
[ARCHIVES](#)
[ANNOUNCEMENTS](#)
[HELP](#)

Home > User > Author > Dashboard

Dashboard

Author submission

Below you will find instructions that will assist you with navigating your Author Center. These instructions cover the various stages of submission. Be advised that any journal specific guidelines for authors can be found in the **"Information"** section at the top right hand corner of the site.

New Submissions

- To **start the submission** of a new manuscript, click on the submit a new manuscript link in the "Author Resources" area below.
- To **continue** with the submission of a new manuscript already in progress, click on the "Unsubmitted Manuscripts" queue in the "My Manuscripts" area below. Find the submission you wish to continue with and then click on the "Continue Submission" button.

What is the status of my manuscript?

- To **check the status** of a manuscript you have submitted, click on the "Submitted Manuscripts" queue in the "My Manuscripts" area below. All manuscripts you have submitted that are currently being evaluated will be listed in this area. The status of the manuscript can be found under the column heading 'Status'. Note: You can click on any queue under the 'My Manuscripts' area to view all manuscripts currently in that status.

★ Click [here](#) to submit a new manuscript

Submitted Manuscripts
Unsubmitted Manuscripts
Revised Manuscripts
Archive Manuscripts

Manuscript ID	Date Created	Manuscript Title	Status	Delete
BSP-CNSNDDT-2017-456	01-25	EFFECTS OF SUPRAPHYSIOLOGICAL DOSES OF...	MANUSCRIPT IN REVIEW	

1 - 1 of 1 Items

Anexo 2 – Certificado do comitê de ética em pesquisa do item 2.1

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) 3298-1083



Alfenas, 06 de agosto de 2012.

Prof^{te}. Alessandra Esteves

Prezada Professora;

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

Por ser verdade, firmo o presente.

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

Anexo 3 – Certificado do comitê de ética em pesquisa do item 2.2

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, 19 de dezembro de 2012.

Prof. Wagner Costa Rossi Junior

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 479/2012, intitulado “Análise morfológica e quantitativa de regiões do córtex cerebral de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

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