

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Efeitos comportamentais, neuroquímicos e metabólicos do tratamento com decanoato de nandrolona em camundongos

Eduardo Kalinine

Porto Alegre, abril de 2011.

Efeitos comportamentais, neuroquímicos e metabólicos do tratamento com decanoato de nandrolona em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Básicas da Saúde – Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica.

Orientador: Prof. Luis Valmor C. Portela.

Porto Alegre, abril de 2011.

*"Os conceitos e princípios fundamentais da ciência são invenções livres do espírito humano."
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Iouri Kalinine e Galina Kalinina pelo grande apoio em toda a minha jornada, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Muito obrigado, pois nada seria sem vocês.

Aos professores Diogo Onofre de Souza (“DIOGÃO”) e Luis Valmor Cruz Portela (“ROSKA”) pela oportunidade concedida, como também pela confiança, amizade e por serem meus grandes guias na pesquisa científica.

A minha namorada Kamila Cagliari Zenki pela inspiração, colaboração, companheirismo, paciência e dedicação. Amo-te muito.

Aos professores Diogo Lösch de Oliveira, Diogo Lara e Renato Dutra Dias pelo tempo de dedicação e conhecimento repassados.

Aos colegas do grupo “ROSKA”, Alexandre Pastoris Müller, Eduardo Rigon Zimmer, Aline Rigon Zimmer, Jean Pierre Oses, Clarissa Branco Haas e Vanessa Kazlauckas pela grande ajuda em procedimentos científicos e por terem me ensinado muito sobre a ciência e por tornarem o laboratório alegre e um lugar ótimo de trabalho.

Aos colegas do Grupo do “DIOGÃO”, Julia Moreira Dambois, Marcelo Ganzella, Catiele Antunes, pelas contribuições realizadas minha imensa gratidão.

Aos colegas Sabrina Mioranza, Ana Paula Ardais e Fernanda de Medeiros Flores Nunes, pela ajuda, conhecimentos ensinados, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de todo Departamento, em especial aos amigos dos laboratórios; 24, 26, 28. Muito obrigado por estes anos de convivência, trabalho e amizade.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul – (UFRGS) pela educação de excelência e qualidade.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica (UFRGS), muito obrigado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	6
PARTE I	
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Histórico dos esteróides anabolizantes andrógenos	8
1.2 Classes dos EAA	9
1.3 Mecanismos de ação dos EAA	11
1.4 EAA na aplicação terapêutica	13
1.5 EAA como doping esportivo	15
1.6 Efeitos adversos dos EAA	17
1.6.1 Efeitos dos EAA no SNC	18
1.8 Objetivos	21
1.8.1 Objetivos Gerais	21
1.8.2 Objetivos Específicos	21
PARTE II	
2. METODOLOGIA	23
2.1 Animais e Tratamento	23
2.2 Parâmetros Comportamentais	23
2.2.1 Avaliação da atividade locomotora e exploratória - Campo Aberto	24
2.2.2 Avaliação do comportamento agressivo - Teste do Intruso	24
2.2.3 Teste de memória aversiva de curta e longa duração - Esquiva Inibitória Passiva	25
2.2.4. Teste de memória espacial - Labirinto Aquático de <i>Morris</i>	26
2.2.4.1 Fase de aquisição (<i>treino</i>)	26
2.2.4.2 Fase de evocação (<i>teste</i>)	27
2.2.5 Teste de ansiedade - Labirinto em Cruz Elevado	28
2.3 Parâmetros Neuroquímicos	28
2.3.1 Captação de glutamato em fatias de hipocampo e córtex cerebral	28

2.3.2 Determinação do imunocontéudo de GLT1 por Western blot	29
2.3.3 Teste de viabilidade celular – MTT	30
2.4 Parâmetros Metabólicos	31
2.4.1 Coleta de sangue e obtenção do soro sanguíneo	31
2.4.2 Medida do Peso Corporal e dos Testículos	31
2.4.3 Teste de tolerância à glicose (TTG)	32
2.4.4 Dosagens séricas	32
2.4.4.1 Albumina	32
2.4.4.2 ALT/TGP e AST/TGO	33
2.4.4.3 Creatinina e Uréia	33
2.4.4.4 Colesterol Total e Frações	34
2.4.4.5 Triglicerídeos	35
2.5 Análises estatísticas	35

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros Comportamentais	36
3.1.1 Locomoção espontânea e exploração no campo aberto - <i>tratamento subcrônico</i>	37
3.1.2 Locomoção espontânea e exploração no campo aberto - <i>tratamento crônico</i>	37
3.1.3 Avaliação do comportamento agressivo - Teste do Intruso	38
3.1.4 Teste de memória aversiva – tratamento crônico	40
3.1.5 Teste de memória espacial – tratamento subcrônico	41
3.1.6 Teste de memória espacial – tratamento crônico	42
3.1.7 Avaliação da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado - tratamento crônico	44
3.2 Parâmetros Neuroquímicos	45
3.2.1 Captação de Glutamato	45
3.2.2 Determinação do imunocontéudo de GLT-1	45
3.2.3 Teste de viabilidade celular – MTT	46
3.3 Parâmetros Metabólicos	47
3.3.1 Medida do peso corporal	47
3.3.2 Mensuração do peso dos testículos	48
3.3.3 Dosagens séricas	48

PARTE III	
4. DISCUSSÃO	52
4.1 Parâmetros Comportamentais	52
4.2 Parâmetros Neuroquímicos	57
4.3 Parâmetros Metabólicos	58
5. CONCLUSÕES	61
6. PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMO

Desde a primeira síntese, isolamento e caracterização dos andrógenos, particularmente da testosterona em 1935, diversos homólogos sintéticos foram desenvolvidos com os objetivos de prolongar a atividade biológica, desenvolver administração parenteral e diminuir a atividade androgênica, classe denominada de esteróides anabólicos-andrógenos (EAA). Desde 1940, os EAA são utilizados na clínica para diversos tipos de doenças, destacando-se o hipogonadismo masculino e em terapias para promoção de crescimento. Também são amplamente utilizados para fins estéticos, principalmente para manutenção e promoção do ganho de massa magra corpórea. Devido ao grande aumento do consumo destes fármacos, tanto para fins esportivos como estéticos, há uma necessidade de investigar efeitos comportamentais relacionados ao seu uso exacerbado. Milhares de pessoas se auto-administram EAA em superdoses, o que gera um problema de saúde pública. Os Resultados do presente trabalho demonstram que o uso crônico dos EAA aumento do comportamento de agressivo, e sutil prejuízo da memória espacial e memória aversiva de curta duração, e na atividade exploratória em camundongos machos da linhagem CF1. Os Resultados metabólicos demonstraram que o tratamento crônico com decanoato de nandrolona (DN) não afeta a função hepática e renal, não altera a homeostasia da glicose e nem o peso corporal, mas diminui os níveis séricos de colesterol total, HDL e triglicérides. Os resultados neuroquímicos apontam para uma ruptura da homeostase glutamatérgica, através da alteração da captação de glutamato e do imunocontéudo do transportador GLT 1. Em conclusão, o uso crônico com altas doses de DN causa o aumento do comportamento agressivo e diminuição na memória aversiva de curta duração. O desequilíbrio da função glutamatérgica evidenciado pela diminuição da captação de glutamato no córtex e hipocampo e do transportador GLT-1-pode ser um dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nas alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com o DN.

Palavras-chave: Esteróides Anabólicos-Andrógenos, Sistema Nervoso Central, Agressividade, Memória, Sistema Glutamatérgico.

ABSTRACT

Since the first synthesis, isolation and characterization of androgens, particularly testosterone in 1935, several synthetic counterparts were developed with the objective of prolonging the biological activity, parenteral administration and decrease the androgen activity, called the class of anabolic-androgenic (AAS). Since 1940, AAS are used in the clinic for several types of diseases, especially in male hypogonadism and therapies to promote growth. Additionally, they are widely used for esthetic purposes, mainly for maintenance and promotion of lean body mass gain. Due to the large increase in consumption of these drugs, both for aesthetic purposes and sports, the investigation of behavioral effects related to its overuse is imperative. Thousands of people self-administer AAS in overdoses, a fact that creates a public health problem. The results of this study demonstrate that chronic administration of AAS cause an increase in aggressive behavior, and subtle impairment of spatial memory and short-term aversive memory in male mice strain CF1. The metabolic results showed that chronic treatment with Nandrolone Decanoate (DN) neither affect hepatic and kidney function, nor glucose homeostasis and body weight but decreased serum levels of total cholesterol, HDL and triglycerides. The neurochemical results suggest a disruption of glutamatergic homeostasis through changes in glutamate uptake and GLT1 immunocontent. In conclusion, the chronic use at high doses of DN causes increase of aggressive behavior impairs short-term avoidance memory. The imbalance of glutamatergic function evidenced by the decreased glutamate uptake in cortex and hippocampus as well as decreased immunocontent of GLT-1 may participate in the mechanisms underlying behavioral changes induced by chronic treatment with DN.

Keywords: Anabolic-Androgenic Steroids, Central Nervous System, Aggressive Behavior, Memory, Glutamatergic System.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Índice de agressividade dos animais dos grupos CO e DN.

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 - Estruturas químicas de representantes das três classes de EAA

Fig. 2 - Diferentes vias metabólicas da Testosterona (T)

Fig. 3 - Estrutura química dos principais EAA comumente utilizados de forma abusiva.

Fig. 4 - Gráficos obtidos da análise dos parâmetros do campo aberto – Tratamento subcrônico.

Fig. 5 - Gráficos obtidos da análise da tarefa de campo aberto - Tratamento crônico.

Fig. 6 - Gráficos obtidos da análise da tarefa de campo aberto - Tratamento subcrônico.

Fig. 7 - Gráfico obtido da análise da agressividade.

Fig. 8 - Gráfico obtido da análise da agressividade

Fig. 9 - Gráficos obtidos da análise memória aversiva na esQUIVA inibitória - Tratamento crônico.

Fig. 10 - Gráficos obtidos da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento subcrônico.

Fig. 11 - Gráficos obtidos da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento subcrônico.

Fig. 12 - Gráfico obtido da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento crônico.

Fig. 13 - Gráficos obtidos da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento crônico.

Fig. 14 - Gráficos obtidos da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento crônico.

Fig. 15 - Gráficos obtidos da análise da memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - Tratamento crônico.

Fig. 16 - Gráficos obtidos da análise da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado - Tratamento crônico

Fig. 17 - Gráficos obtidos da análise da captação de glutamato em fatias de hipocampo - Tratamento subcrônico/Tratamento crônico.

Fig. 18 - Gráficos obtidos da análise captação de glutamato em fatias de córtex- Tratamento subcrônico/Tratamento crônico.

Fig. 19 - Gráficos obtidos da análise do imunocnteudo por *Western Blot* de transportadores de glutamato GLT1 - Tratamento subcrônico/Tratamento crônico.

Fig. 20 - Gráficos obtidos da análise do teste de viabilidade mitocondrial (MTT) em fatias do hipocampo - Tratamento subcrônico/Tratamento crônico.

Fig. 21 - Gráficos obtidos da análise do teste de viabilidade mitocondrial (MTT) em fatias do córtex- Tratamento subcrônico/Tratamento crônico.

Fig. 22 - Gráficos obtidos da análise do peso corporal ao longo dos tratamentos subcrônico e crônico.

Fig. 23 - Gráfico obtido da análise do peso dos testículos - Tratamento crônico.

Fig. 24 - Gráfico obtido da análise do teste de tolerância à glicose nos tempos 0, 30 ,60, 120 minutos após a injeção i.p de glicose – Tratamento crônico.

Fig. 25 - Gráficos obtidos da análise dos níveis sistêmicos: Albumina, Creatinina, ALT/TGP, AST/TGO e Uréia.

Fig. 26 - Gráficos obtidos da análise dos níveis sistêmicos de colesterol HDL, colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB – Albumina

ALT/TGP – Alanina Amino Transferase/ Transaminase Glutâmico-Pirúvica

AMPA – (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid)

AST/TGO – Aspartato Amino Transferase/ Transaminase Glutâmico-Oxalacética

CO – Controle

DHT– Diidrotestosterona

DMSO – Dimetilsulfóxido

DN – Decanoato de Nandrolona

DNA – Ácido desoxiribonucléico

EAA – Esteróides Anabólicos Andrógenos

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

GLAST – Transportador de glutamato e aspartato

GLT1 – Transportador de glutamato 1

HBSS – Solução Salina Balanceada de Hanks

HDL – Lipoproteína da alta densidade

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

i.p – Intraperitoneal

IA – Índice de Agressividade

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado.

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NMDA – N-metil D-Aspartato

RA – Receptores Andrógenos

RE – Receptores Estrógenos

RNA – Ácido ribonucléico

s.c – Subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

T – Testosterona

TCA – Ácido tricloro acético

TTG – Teste de tolerância à glicose

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico dos esteróides anabolizantes andrógenos

Desde a primeira síntese, isolamento e caracterização dos hormônios andrógenos, particularmente da testosterona (T), muitos estudos foram desenvolvidos na tentativa de explicar os seus efeitos biológicos (Shahidi, 2001; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Kicman, 2000).

A produção da T ocorre principalmente nas células de Leydig, localizadas nos testículos e em menor quantidade nos ovários e glândulas adrenais (Kopera, 1985; Kochakian, 1993). A T exerce seus efeitos andrógenos e anabólicos em diversas regiões do corpo incluindo os tecidos reprodutivos como testículos e ovários. Além disso, ela também atua em tecidos não reprodutivos como músculo esquelético, tecido ósseo, rins, fígado e sistema nervoso central (SNC), dentre outros (Snyder, 1984; Shahidi, 2001; Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001; Kicman, 2008). A produção endógena da T em um indivíduo saudável do gênero masculino é de aproximadamente 2,5-11 mg/dia sendo que a concentração plasmática varia entre 300-1000ng/dl. Aproximadamente 44% da T secretada é transportada na corrente sanguínea através da globulina ligadora dos hormônios sexuais, 2% permanecem na forma livre e os 54% restantes são rapidamente distribuídos aos tecidos. A ligação a albumina é extremamente baixa (Pardridge, 1986; Bagatell & Bremner 1996).

A ação andrógena é responsável pelo desenvolvimento dos tecidos reprodutivos masculinos e das características sexuais secundárias. No que se refere às ações anabólicas, há estímulo da fixação do nitrogênio e o aumento da síntese protéica (Snyder, 1984; Kicman, 2000; Shahidi, 2001, Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001; Evans-Brown & McVeigh, 2008) Neste contexto, o potencial terapêutico da T foi explorado na clínica, levando ao surgimento

de diversos derivados sintéticos chamados de esteróides anabólicos andrógenos (EAA). Estes análogos sintéticos mimetizam a ação endógena da testosterona reduzindo os seus efeitos androgênicos e prolongando a sua meia vida útil. Entretanto, ainda não foi possível a obtenção de um EAA desprovido dos efeitos andrógenos devido à farmacodinâmica complexa que promove a interação dos compostos com os receptores andrógenos (RA) (Snyder, 1984; Kicman, 2000; Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001, Shahidi, 2001). Atualmente, mais de 100 derivados sintéticos de EAA já foram desenvolvidos na tentativa de retardar a rápida biotransformação da T, aumentar o tempo de vida útil, melhorar os efeitos anabólicos e diminuir os efeitos andrógenos (Shahidi, 2001).

1.2 Classes dos EAA

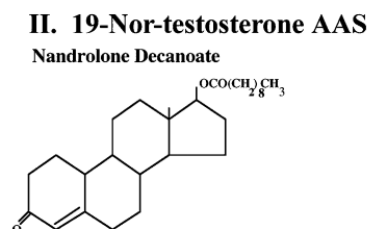
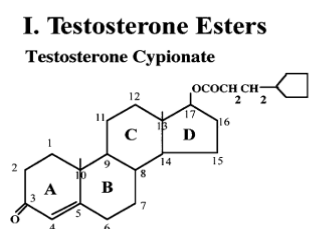
Os EAA, assim como os andrógenos endógenos, são estruturas de quatro anéis com 19 átomos carbono. Existem três principais classes de EAA conforme a **Figura 1** (Clark & Henderson, 2003).

A primeira classe é representada por compostos injetáveis, ésteres do grupo 17- β -hidroxil (propionato e cipionato de testosterona). A esterificação protela a degradação do composto e prolonga o tempo de ação devido à liberação sistêmica mais lenta (Shahidi, 2001; Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001). Os ésteres de testosterona podem ser hidrolisados a testosterona livre; reduzidos a 5 α -dihidrotestosterona, um metabólito com maior atividade biológica, devido a sua maior afinidade pelos RA do que a T, essa pode ser aromatizada a estrógenos pela ação da enzima aromatase (Martini, 1982; Kochakian, 1993; Winters, 1990).

A segunda classe refere-se a compostos injetáveis que abrangem os derivados da 19-nortestosterona. Estes compostos derivam dos ésteres de T através da adição de uma cadeia carbonada longa no C17. Também sofrem a substituição de um hidrogênio por uma metila no

C19. Nesta classe de EAA está inserido o decanoato de nandrolona (DN). A desmetilação do C19 aumenta a meia-vida desta classe de compostos e contribui para sua estereificação. Mesmo havendo a homologia estrutural que envolve a ligação dupla entre C4-C5 no DN (importante para a ligação ao RA), o alongamento da cadeia confere atividade androgênica reduzida em relação a diidrotestosterona pela consequente redução da afinidade ao RA. O DN como outros ésteres de testosterona da 1ª classe, pode ser aromatizado a 17β estradiol, embora isso não ocorra de maneira tão eficiente quanto em relação à testosterona (Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001; Ryan, 1959; Winters 1990; Shahidi 2001). Os EAA aromatizáveis, tanto da 1ª classe, quanto da 2ª classe, possuem efeitos significativos no SNC não somente pela interação farmacológica direta com RA, mas também através de metabólitos ativos (estrógenos) que se ligam a receptores estrogênicos (RE) cerebrais (Wilson, 1988).

A terceira classe refere-se aos compostos alquilados no C17 incluindo a metiltestosterona, oximetolona, metandrostenolona e estanozolol. O processo de alquilação dificulta a metabolização hepática, possibilitando a este grupo de EAA ser administrado por via oral. Não há conversão de esteróides 17α- alquilados a diidrotestosterona ou 17β-estradiol, porém outros metabólitos andrógenos e estrógenos ativos podem ser formados (Winters, 1990; Basaria, Wahlstrom & Dobs 2001).



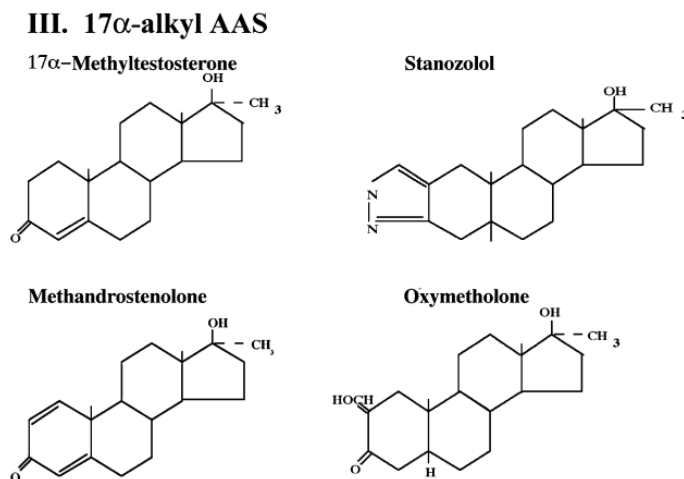


Fig. 1 - Estruturas químicas dos representantes das três principais classes de EAA: **I**; derivados de ésteres de testosterona, **II**; derivados da 19-nortestosterona e **III**; compostos alquilados no C17. Figura adaptada de Clark & Henderson, 2003.

1.3 Mecanismos de ação dos EAA

Na maioria das células-alvo, a T atua através de um metabólito ativo, a diidrotestosterona (DHT), a qual é convertida localmente por uma enzima 5 α -redutase. A T e a DHT se ligam ao receptor androgênio RA. Outro metabólito hormonalmente ativo da T é o estradiol que se liga ao receptor estrogênico RE conforme a **Figura 2** (Rang & Dale, Farmacologia, tradução da 6^a edição). Durante o estado inativo, ausência hormonal, os RA e RE interagem com proteínas nucleares; chaperonas e cochaperonas (Pratt & Toft 1997; Buchner, 1999).

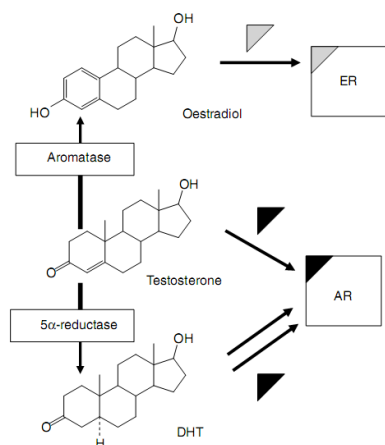


Fig. 2 - Diferentes vias metabólicas da Testosterona (T)

DHT – Dihidrotestosterona (DHT)

ER - Receptores estrógenos (RE)

AR - Receptores andrógenos (RA)

Figura adaptada de Kicman, 2008

Por seu caráter lipofílico, a T e os EAA, dentre outros esteróides, atravessam as membranas biológicas muito facilmente. No ambiente intracelular há formação do complexo hormônio-receptor, através de uma ligação específica, que depende das características químicas de cada esteróide (Goodman & Gilman, tradução da 9ª edição). Os andrógenos ligam-se aos RA citoplasmáticos, e tal ligação é acompanhada da interação dos complexos resultantes com sítios nucleares e efeitos genômicos subsequentes – transcrição de genes (elaboração de RNA a partir de DNA e síntese de proteínas) ou repressão de genes (inibição da transcrição). Estas ações caracterizam a via denominada “via clássica” de ação dos esteróides (Rang & Dale, Farmacologia, tradução da 6ª edição).

Existe ainda outra via de sinalização destes hormônios denominada “via rápida”, que pode ocorrer independentemente da ligação aos RA e RE. O efeito rápido dos hormônios esteróides consiste basicamente na alteração da fluidez da membrana plasmática através de três distintos mecanismos de ação: efeito que ocorre na membrana plasmática independente de ligação ao receptor; efeito que ocorre na membrana plasmática através da ligação a receptores que não RA ou RE; efeitos que ocorrem na membrana plasmática decorrentes da ligação aos RA ou RE. Na via rápida, há alteração nas vias de sinalização envolvendo, por exemplo, proteínas como adenilato ciclase, proteína cinase ativada por mitógeno e

fosfatidilinositol 3-cinase (Falkenstein et al., 2000; Cato, Nestl & Mink, 2002; Kicman, 2008).

1.4 EAA na aplicação terapêutica

A aplicação clínica dos andrógenos (EAA) deve ser analisada conforme a relação entre suas estruturas químicas e as propriedades biológicas, e geralmente é limitada pela seletividade tecidual, farmacocinética e toxicidade sistêmica e central. Estas variáveis tendem a ser moduladas no processo de produção de análogos sintéticos, os quais buscam a diminuição dos efeitos masculinizantes (Snyder, 1984; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Kicman, 2008).

A indicação mais clara para terapia androgênica é o hipogonadismo masculino, onde o tratamento é capaz de restabelecer os níveis normais da testosterona plasmática, substituindo algumas das funções testiculares conhecidas, exceto a espermatogênese (Goodman & Gilman tradução da 9ª edição). Originalmente, além do tratamento da disfunção hipogonadal, os andrógenos foram aplicados na terapia do retardo da puberdade e na promoção de crescimento corporal (Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001). Devido aos seus efeitos benéficos no aumento da ingestão de alimentos, manutenção e promoção do ganho de massa magra corpórea, os EAA tem sido empregados com sucesso no tratamento de queimaduras, na recuperação pós-operatória, anemias, politraumatismos, osteopatologias (osteoporose) e doenças com perda de massa muscular (caquexia) (Shahidi, 2001; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Evans, 2004; Evans-Brown & McVeigh, 2008).

O uso dos EAA no tratamento de anemias, por exemplo, é baseado na observação de que os níveis de hemoglobina são menores em homens com hipogonadismo do que nos homens normais (eugonadais). O tratamento com EAA aumentou os níveis de hemoglobina em homens com hipogonadismo. Os andrógenos parecem exercer esse efeito devido à

estimulação da secreção de eritropoietina pelos rins. Entretanto, a administração da T a homens eugonadais causou somente um pequeno aumento na concentração da hemoglobina. O aumento da hemoglobina é maior quando são administrado ésteres de testosterona injetáveis, quando comparados a forma de administração oral. Nesse sentido, alguns estudos clínicos sugerem que os EAA como, por exemplo, o DN aumenta os níveis de hemoglobina (Malgar & Fisher, 1970; Cunningham et al., 1979; Snyder, 1984; Gaughan et al., 1997; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001). Os andrógenos induzem a produção do inibidor da esterase C1, cuja deficiência é uma das causas para a manifestação da angioedema hereditário. Por outro lado, o Danazol, um análogo da T, inibe a atividade da esterase C1, e pelo seu fraco caráter andrógeno, este fármaco tem sido preferencialmente utilizado para tratamento da angioedema (Gelfand et al., 1976; Snyder, 1984).

Os andrógenos têm sido utilizados como coadjuvantes no tratamento de câncer de mama, por causarem uma regressão temporária de tumores sensíveis à ação de hormônios e apresentarem efeitos benéficos sobre a composição corporal (aumento de massa magra) (Kennedy, 1974; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001).

Alguns estudos experimentais e clínicos têm demonstrado efeitos positivos do tratamento com EAA na recuperação pós cirurgias (Falangia et al., 1998). Eles foram capazes de auxiliar na recuperação de lesões teciduais e no ganho de massa corporal em indivíduos em que o uso da suplementação nutricional sozinha não produziu melhorias significativas nestes parâmetros (Demling & DeSanti, 1998; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001).

Na hepatite alcoólica, o tratamento com EAA 17 α -alquilados (oximetolona), associado à suplementação nutricional, levou a uma melhora da função hepática com um conseqüente aumento da sobrevivência dos pacientes. Contudo, a administração dos EAA sem a combinação com suplementação nutricional não causou efeito benéfico, ao contrário, agravaram a toxicidade hepática. Neste sentido, mais estudos são necessários para avaliar a

utilização terapêutica dos EAA nesta patologia (Mendenhall et al., 1984; Snyder, 1984; Mendenhall et al., 1995; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001).

Nos pacientes com queimaduras severas, o tratamento com EAA diminuiu a degradação protéica, favoreceu o ganho de peso corporal, aumentou a retenção de nitrogênio e diminuiu o período de recuperação (Demling & DeSanti, 1997; Demling & DeSanti, 2001).

Com o aumento da utilização dos esteróides na terapêutica, os estudos contemporâneos têm buscado avaliar a aplicação clínica dos EAA no tratamento de patologias crônicas como caquexia associada ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001).

Embora a indicação do tratamento com EAA para pacientes com doença crônicas têm sido frequentemente recomendado, a sua utilidade para atenuar a perda de massa corpórea associada a enfermidades, assim como a aplicação clínica dos EAA deve ser mais profundamente investigada, bem como as vantagens e desvantagens devem ser consideradas na escolha adequada do EAA (Snyder, 1984; Basaria, Wahlstrom, & Dobs, 2001; Kicman 2008).

1.5 EAA como doping esportivo

O primeiro relato da utilização de EAA com objetivos não terapêuticos ocorreu em 1954, na Áustria. Desde então estas substâncias vêm despertando a atenção de profissionais da área da saúde e pesquisadores devido à sua utilização por atletas profissionais e amadores, com o objetivo de aumentar a massa muscular, melhorar o desempenho físico e a estética corporal (Creutzberg et al., 1999; Cunha et al., 2004; Brooks, Firth & Summer, 1975).

O uso abusivo dos EAA por atletas de elite se difundiu entre 1950 – 1960 nos países do leste Europeu, coincidindo com o término da Segunda Guerra Mundial e com o

crescimento da indústria farmacêutica (Handelsman & Heather, 2008). O uso exacerbado de EAA no meio desportivo para melhorias no desempenho físico tornou-se público em 1970. Em 1974, o uso destas substâncias sintéticas foi banido pelo Comitê Internacional de Jogos Olímpicos (Schänzer, 1996; Brooks & Reddon, 1996). De acordo com a Agência Mundial de *Anti-doping*, estas substâncias químicas são proibidas devido a três critérios: por melhorar o desempenho dos atletas, por representarem um risco a saúde e violarem o espírito esportivo (Handelsman & Heather, 2008). Os andrógenos continuam sendo as drogas ergogênicas mais efetivas e utilizadas pelos atletas, sendo, portanto, as substâncias predominantemente encontradas em testes de *anti-doping* (Handelsman & Heather, 2008).

Graves problemas de saúde e sociais associados ao uso abusivo não são raros. A maioria dos usuários dos EAA apresenta efeitos adversos como acne (40%-54%), atrofia testicular (40%-51%), ginecomastia (10%-34%), estrias cutâneas (34%) e dor no local da injeção (36%) (Bolding, Sherr & Elford, 2002; Evans, 1997; Evans, 2004).

Os estudos demonstram que o benefício da atividade anabólica dos EAA em indivíduos saudáveis ocorre quando administradas em superdoses (10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas). Poucas semanas após a suspensão do tratamento, a massa e força muscular decaem, por isso faz-se necessário a aplicação crônica destas substâncias pelos atletas, para manutenção dos efeitos anabólicos desejados (Lukas, 1993; Clark, Mitre & Brinck-Johnsen 1995; Grivetti & Applegate 1997; Sjöqvist, Garle & Rane 2008).

O aumento da massa muscular e da força, diminuição do tempo de recuperação após a sobrecarga de treinamento, aumento de agressividade, diminuição do tempo de recuperação das lesões estão entre os efeitos desejados pelos atletas que utilizam a superdosagem com EAA (Hough, 1990; Maravelias et al., 2005).

Passadas algumas décadas, os EAA deixaram de serem consumidos somente pela elite desportiva e passaram a serem utilizados pela população em geral (Evans-Brown & McVeigh,

2008). Atualmente, o aumento do comércio destes fármacos (20-30% ao ano) para fins não terapêuticos, tornou-se um problema de saúde pública (Evans, 2004). Em resposta ao aumento do consumo destas substâncias, à fabricação clandestina e comércio ilegal, em 1991 os EAA foram classificados como substâncias de uso controlado do tipo 3 pelo congresso norte americano (Shahidi, 2001; Sjöqvist, Garle & Rane 2008). No Brasil estes fármacos também são substâncias de consumo controladas (Kitman, 2008).

Os três EAA comumente utilizados de maneira abusiva são: testosterona, nandrolona e estazonol (**Figura 3**), sendo este último, incapaz de ser aromatizado a estrogênio (McGinnis, 2004).

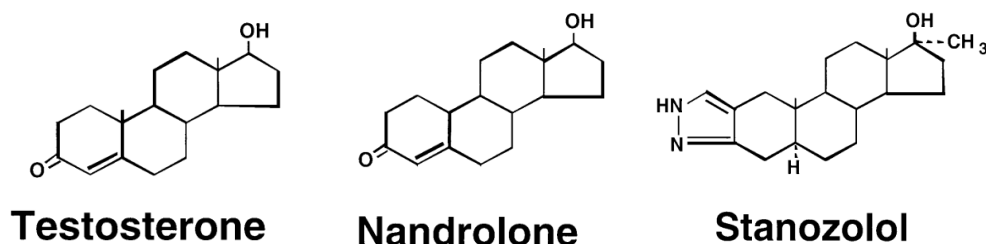


Fig. 3 - Estrutura química dos EAA comumente utilizados de forma abusiva. Figura adaptada de McGinnis, 2004.

1.6 Efeitos adversos dos EAA

Muitos relatos na literatura indicam que um número consideravelmente importante de atletas aceita os riscos da utilização dos EAA (Hartgens & Kuipers, 2004). Os efeitos indesejados que decorrem da utilização de tais substâncias se relacionam com a dose, frequência de uso, idade e interações medicamentosas (Bahrke & Yesalis, 2004; Maravelias, et al., 2005).

O uso abusivo pode causar dano irreversível em diversos órgãos entretanto, mesmo em doses clínicas, os EAA apresentam efeitos adversos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e

doenças cardiovasculares. Os efeitos adversos mais comuns dos EAA são decorrentes do efeito andrógeno, podendo-se destacar a masculinização em mulheres e crianças e mudanças comportamentais (agressividade). As alterações nos níveis plasmáticos de lipídios podem estar associadas ao surgimento de problemas no sistema cardiovascular (Shahidi, 2001; Snyder, 1984; Evans, 2004).

Diversos estudos demonstram que o tratamento clínico com andrógenos apresenta significantes reduções da lipoproteína de alta densidade (HDL) e concomitante aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Glazer, 1991; Evans, 2004; Kitman, 2008). No estudo de Bonetti et al., 2008 realizado em fisiculturistas, a auto-administração de combinações de classes de EAA, em doses supra fisiológicas, acarretou na diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, insulina, globulina de ligação a hormônio sexual, HDL e, concomitantemente, alterações nos níveis de linfócito T (glóbulos brancos), diminuição da contagem de espermatozoides e diminuição de índice de fertilidade. Também são relatadas alterações no SNC com importantes implicações morfológicas e comportamentais (Snyder, 1984; Lukas, 1993; Rockhold, 1993; Sjöqvist, Garle & Rane, 2008).

1.6.1 Efeitos dos EAA no SNC

Os andrógenos têm papel crítico no comportamento masculino, embora este seja profundamente influenciado por fatores psíquicos, sociais, somáticos e culturais. Estudos demonstram que os EAA podem ter atividade deletéria sobre o SNC de humanos que pode se manifestar por alterações morfológicas, funcionais e comportamentais. O aumento da agressividade, euforia, depressão, transtornos de humor, alterações na libido, e em casos mais graves, até alucinações (psicose) são freqüentemente relatados em indivíduos que utilizam os EAA (Parrott, Choi & Davies 1994; Cooper et al., 1996; Su et al., 1993; Hartgens & Kuipers, 2004; Uzych, 1992; Hall, Hall & Chapman, 2005). Em humanos, o uso de EAA também está

fortemente associado com comportamento agressivo e violento, todavia cabe ressaltar que a agressividade é uma resposta biológica natural, proeminente no gênero masculino, na busca da satisfação das necessidades básicas como comida e água, abrigo e território. Nos mamíferos, a agressividade é geralmente empregada para a defesa do território e acesso às fêmeas. Ao contrário, a violência é uma inapropriada, inadequada ou exagerada expressão de agressividade (McGinnis et al., 2004).

Os andrógenos são reconhecidos como moduladores do comportamento agressivo (Barfield, Busch & Wallen 1972; Svare, 1990). Em modelos experimentais com roedores, o comportamento agressivo associado ao uso do EAA é de caráter contraditório, pois a análise dos resultados é afetada por diversas variáveis, como a classe, a combinação ou não de classes de EAA, dose, gênero, tempo de tratamento, idade dos animais e a metodologia empregada para avaliar o comportamento agressivo (Henderson, 2003; McGinnis, 2004). A maioria dos estudos sobre os efeitos dos EAA no comportamento agressivo utilizam roedores machos (Christie & Barfield 1979; Clark & Henderson 2003).

Sabe-se muito pouco sobre os efeitos dos EAA na ansiedade. O primeiro estudo destes efeitos dos EAA foi realizado por Bitran et al., 1993 o qual demonstrou que altas doses de propionato de T alteram o comportamento de ratos *Long-Evans* no aparato de labirinto em cruz elevado. Neste estudo, os animais foram testados em 6 e 14 dias de tratamento com propionato de T. Com 6 dias de tratamento, os animais aumentaram a exploração nos braços abertos, isto é, teve um efeito ansiolítico. Porém com 14 dias de tratamento, os animais tratados com o propionato T não foram diferentes do grupo controle. Estes resultados indicam um caráter ansiolítico transitório do tratamento com o propionato de T. De uma maneira geral os poucos estudos que abordaram EAA e ansiedade apresentam resultados controversos. Mais especificamente, o tratamento com DN em ratos apresentou tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos (Bitran et al., 1993; Clark & Henderson, 2003).

Da mesma forma, a ação dos EAA em parâmetros como aprendizado e memória tem sido pouco explorados. O estudo de Clark et al., 1995, avaliou a memória espacial de ratos machos no labirinto aquático de *Morris* (*Water Maze*). Neste, os animais tratados com combinações de EAA não demonstraram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle. Em contrapartida, o estudo de Magnusson et al., 2009 demonstrou que o tratamento de 14 dias com DN (15mg/kg) em ratos machos *Sprague–Dawley* causou prejuízo na memória espacial no labirinto aquático de *Morris*. Por outro lado, Smith et al., 1996 testou os efeitos do tratamento crônico (30 dias) com os EAA sobre a memória espacial no aparato labirinto radial em ratos machos e não encontrou diferenças entre os grupos tratados e controle. Assim, torna-se evidente a necessidade de considerar que combinações ou uso individual de EAA, dose, tempo de tratamento e metodologia são variáveis que limitam conclusões mais seguras (Clark & Henderson, 2003). Os relatos a respeito dos efeitos dos EAA sobre a locomoção espontânea no campo aberto ou câmara de atividade, tanto com ratos como em camundongos machos, demonstram que este parâmetro comportamental não é afetado pelo tratamento (Bing et al., 1998; Bitran et al., 1993; Bronson, 1996; Clark e Fast, 1996; Clark e Harrold, 1997; Clark, Harrold e Fast, 1997; Martínez-Sanchis et al., 1996; Martínez-Sanchis et al., 2002; Minkin, Meyer & Van Haaren, 1993).

Algumas evidências recentes indicam que os EAA podem alterar aspectos morfológicos e neuroquímicos de sinapses glutamatérgicas no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral e, com isso, ter implicações comportamentais importantes (Le Greves et al., 1997; Rossbach et al., 2007). O sistema glutamatérgico é o principal mecanismo de neurotransmissão excitatório do sistema nervoso central de mamíferos. Ele está envolvido em processos de memória e aprendizado, proliferação e sobrevivência celular. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato se liga a seus receptores do tipo ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) e/ou metabotrópicos (acoplados a proteínas G). A remoção do glutamato da fenda

sináptica é feita por transportadores específicos, principalmente astrocitários, que protegem os neurônios da excitotoxicidade decorrente dos altos níveis de glutamato na fenda sináptica (Danbolt, 2001). A hiperestimulação glutamatérgica causa aumento do Ca^{2+} intracelular, causando dano neuronal e reatividade glial. Dos 5 transportadores de glutamato em mamíferos clonados, GLAST e GLT-1 (predominantemente localizados em astrócitos) são os principais responsáveis pela manutenção do tônus glutamatérgico fisiológico (evitando o tônus neurotóxico) (Anderson & Swanson, 2000).

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivos Gerais

Investigar efeitos comportamentais, neuroquímicos e metabólicos do tratamento com decanoato de nandrolona (DN) em camundongos machos. Para tanto utilizaremos uma dose suprafisiológicas diária em protocolos de tratamento subcrônico e crônico.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do DN na memória espacial; memória aversiva; ansiedade; locomoção/exploração espontânea; e agressividade;
- Avaliar a influência do tratamento com DN na captação de glutamato; no imunocconteúdo de GLT-1 e na viabilidade mitocondrial em preparações de córtex e hipocampo;
- Avaliar a influência do DN no peso corporal e peso dos testículos dos animais.
- Analisar o perfil funcional e metabólico sistêmico pelo teste de tolerância à glicose, dosagens séricas de albumina, creatinina, ALT/TGP, AST/TGO, uréia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos.

PARTE II

2. METODOLOGIA

2.1 Animais e Tratamento

Neste estudo foram utilizados 150 camundongos albinos da linhagem CF1 com 70 a 80 dias de idade e peso entre 40 e 50g, obtidos da FEPPS, Porto Alegre/Brasil. Os animais foram ambientados uma semana antes do início do tratamento. Eles foram mantidos em gaiolas (30x20x10cm), com ciclo claro – escuro de 12 horas e com acesso livre a água e dieta padrão do biotério da instituição. Os animais foram divididos em dois grupos: a) (DN) animais tratados com DN Organon® (n=75) na concentração de 15 mg/Kg; b) (CO) animais controles, tratados com veículo oleoso (n=75). Os grupos CO e DN receberam injeções subcutâneas (s.c) diárias na região dorsal por um período de 20 dias consecutivos de tratamento (crônico) ou 3 dias consecutivos de tratamento (subcrônico).

Os testes comportamentais iniciaram no 3º dia para o grupo de tratamento subcrônico e 14º dia de tratamento para o grupo crônico. Durante a realização dos testes comportamentais os animais foram mantidos em tratamento com DN. As tarefas de campo aberto, agressividade, esQUIVA inibitória passiva e labirinto em cruz elevado foram realizadas de acordo com o protocolo de Kazlauckas et al., 2005, e o labirinto aquático de *Morris* acordo com o protocolo de Müller et al., 2010.

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado para realização de ensaios bioquímicos, o córtex e hipocampo dissecados para os ensaios neuroquímicos e os testículos foram removidos e pesados para posterior análise.

2.2 Parâmetros Comportamentais

2.2.1 Avaliação da atividade locomotora e exploratória - Campo Aberto.

O aparelho de campo aberto é uma arena de formato quadrado com as paredes confeccionadas em madeira MDF pintada em cor preta (50 x 50 x 50 cm), dividida em dois campos (central e periférico). Os parâmetros comportamentais observados neste teste são: distância percorrida (no centro e na periferia), o tempo de permanência em cada quadrante e o número de cruzamentos. O comportamento foi registrado utilizando uma câmera de vídeo e a posterior análise dos dados foi efetuada com auxílio do programa ANY-MAZE®. Entre a tarefa com cada animal o aparato foi limpo com álcool 70%. A iluminação no centro do Campo Aberto utilizada foi de 7 lux. Os animais foram filmados por 10 minutos de acordo com protocolo de Kazlauckas et al., 2005.

Para o tratamento subcrônico os animais foram testados com 3 dias de tratamento e para análise do tratamento crônico os animais foram testados com 15 dias de tratamento.

As variáveis avaliadas nesta tarefa foram: a locomoção e exploração espontânea através da observação das variáveis como: a distância total percorrida no aparato (m), distância total percorrida no centro do aparato (m), velocidade média (m/s), número de entradas no centro do aparato, número de cruzamentos entre a periferia o centro do aparato e o tempo de permanência no centro do aparelho (seg) em 10 minutos de observação.

2.2.2 Avaliação do comportamento agressivo - Teste do Intruso.

Pelo período de 2 dias que antecediam o teste, todos os animais, CO e DN, permaneceram no ambiente de confinamento sem troca de maravalha, com a finalidade de demarcação territorial através do odores impregnados na caixa. No dia do teste, a avaliação do comportamento agressivo foi realizada imediatamente após o animal permanecer sozinho em sua caixa por 2 minutos. Transcorrido este tempo, um macho intruso (oponente) foi colocado dentro da caixa com o macho residente; tanto o roedor intruso quanto o residente foram

testados somente uma vez na tarefa. Os comportamentos dos machos residentes e intrusos foram registrados em arquivos de vídeo por 10 minutos. Os comportamentos como postura dominante, postura subordinada, postura neutra, latência do primeiro ataque e a quantidade de ataques do animal residente foi analisada de conforme Kazlauckas et al., 2005.

Neste teste de Intruso, foi realizada uma avaliação cronológica do efeito do DN sobre a agressividade durante 3º, 8º, 10º, 16º, 18º dias, assim como 2 dias após a suspensão do tratamento crônico (20 dias). Após 20 dias de tratamento foram determinados os índices de agressividade. Para a análise de variáveis como latência do primeiro ataque e número de ataques, os dias de análise do grupo CO foram pareados com os do grupo DN.

O Índice da Agressividade consiste de observações como postura dominante, postura neutra e postura subordinada. Estas classificações posturais seguiram os seguintes critérios: dominante, quando o animal residente inferia o primeiro ataque no animal intruso; neutro, quando o animal residente não atacava o animal intruso; e subordinado quando o animal residente era atacado pelo animal intruso. Quando a iniciativa de ataque partia do animal intruso sobre os animais residentes CO ou DN, estes foram excluídos da análise das seguintes variáveis: latência do primeiro ataque e número de ataques. Entretanto os animais residentes CO e DN previamente atacados foram incluídos nos dados demonstrativos do Índice de Agressividade (animal com postura submissa).

Para fins de cálculo, a determinação do índice de agressividade dos animais (IA) utiliza a seguinte equação: $IA = (Na - Ns)/n$ Onde: **IA** – Índice de agressividade, **Na** – número de agressores, **Ns** – número de submissos, **Nn** – número de neutros, **n** – tamanho da amostra investigada.

2.2.3 Teste de memória aversiva de curta e longa duração - Esquiva Inibitória Passiva.

A tarefa da Esquiva Inibitória Passiva envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva, que consistiu em uma sessão de treino, na qual o animal recebeu um choque de baixa intensidade (0.4 mA, 0.7 segundos de duração) ao descer da plataforma com as quatro patas. Na sessão de teste, 90 minutos e 24 horas após o treino, o animal foi exposto novamente àquele ambiente, testando-se então a sua memória. Para avaliar a retenção da memória, foi medido o tempo de latência para descer da plataforma. Tratando-se de um aprendizado adquirido em uma única tentativa, o método se torna ideal para o estudo de processos de memória e aprendizado associados ao hipocampo. Entre a sessão de treino e a sessão de teste, o aparato foi limpo com álcool 70%. O protocolo foi realizado de acordo com Kazlauckas et al., 2005.

2.2.4. Teste de memória espacial - Labirinto Aquático de *Morris*.

Consiste em uma piscina circular de cor preta (110 cm de diâmetro e 100 cm de altura), preenchida com 50 cm de água. A cada 90° da piscina foram inseridas pistas geométricas para possibilitar a orientação espacial do animal (totalizando 4 pistas). Esta piscina foi dividida por duas linhas virtuais utilizando o programa ANY-MAZE® formando 4 quadrantes. O experimentador permaneceu na mesma posição durante toda a sessão de treino, a aproximadamente 100 cm da borda da piscina. Uma câmera de vídeo foi instalada sobre o centro do tanque e os animais foram filmados durante a execução da tarefa para posterior análise dos resultados no programa ANY-MAZE®. Tanto nos treinos como no dia do teste a temperatura da água foi controlada permanecendo entre $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a temperatura da sala também permanecia constante em $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a iluminação da sala utilizada foi de 7 lux. O protocolo foi adaptado de Müller et al., 2010.

2.2.4.1 Fase de aquisição (treino)

Os camundongos receberam 5 sessões consecutivas de treino e foram submetidos a 4 tentativas por treino, com o objetivo de encontrar a plataforma submersa a 1,5 cm do nível da água em um determinado quadrante. O intervalo entre as tentativas foi de 10 a 15 minutos. A plataforma permaneceu no mesmo lugar durante toda a fase de aquisição (treino). Todos os animais, de todos os grupos, devem ser capazes de nadar durante os treinos, caso contrário, foram descartados do experimento. Em cada treino, o animal foi colocado na água com o focinho virado para a borda do tanque, alternando cada uma das quatro posições de largada (Norte, Sul, Leste e Oeste), de forma que o mesmo camundongo não partisse duas vezes da mesma posição no mesmo dia, e tal seqüência não foi repetida nos dias subseqüentes. Após ser colocado na água, foi permitido a cada camundongo nadar livremente na piscina para procurar a plataforma, durante 60 segundos. Uma vez localizada a plataforma, foi permitido aos animais permanecerem sobre ela por 20 segundos. Se o animal não encontrasse a plataforma nos 60 segundos previamente determinados, ele seria guiado gentilmente pelo experimentador, e permaneceria sobre a plataforma por 20 segundos. Depois de cada treino, cada roedor foi removido da plataforma, seguindo-se o processo de secagem com toalhas e a devolução a sua caixa de origem (Müller et al., 2010).

2.2.4.2 Fase de evocação (teste)

Um dia após o último treino (6º dia), a plataforma foi removida, e cada roedor foi submetido a um teste de 60 segundos. O animal foi colocado na água, nas mesmas condições do teste, entretanto a plataforma se faz ausente, garantindo que o animal permaneça por 60 segundos procurando a mesma. O tempo gasto no quadrante da plataforma, distância percorrida, número de entradas na região da plataforma, a latência para o animal entrar na área de localização original da plataforma e o tempo gasto, distância percorrida no quadrante

oposto ao da plataforma foram mensurados para avaliar a retenção de memória espacial (Müller et al., 2010).

2.2.5 Teste de ansiedade - Labirinto em Cruz Elevado

Os camundongos foram submetidos à tarefa do labirinto em cruz elevado, realizada em um aparato que foi totalmente construído de madeira. Com formato de “cruz”, a 40 cm de altura do chão, constituído de dois braços abertos que medem 35 cm de comprimento e 5 cm de largura, entrepostos por um centro de 5x5 cm, por onde cruzam os dois braços fechados, do mesmo comprimento e largura dos braços abertos, porém cercados por paredes de 15 cm de altura. O teste foi conduzido sob luz vermelha (85 lux), em ambiente de penumbra. Os animais foram colocados no centro do aparato com a face voltada para um dos braços abertos da plataforma e foram observados individualmente durante 5 minutos. Os vídeos foram gravados com auxílio de uma câmera e analisados pelo programa ANY-maze®. Registrou-se o tempo total em que os animais permaneceram nos braços abertos, o número de transições entre os braços abertos e fechados, e o número de transições entre os braços abertos em relação a transições totais (%). Após cada análise o aparato foi higienizado com álcool 70% e secado em seguida. O protocolo foi realizado de acordo com Kazlauckas et al., 2005.

2.3 Parâmetros Neuroquímicos

2.3.1 Captação de glutamato em fatias de hipocampo e córtex cerebral

Os animais foram decapitados 12 horas após a última administração do veículo ou DN, e os cérebros foram imediatamente removidos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ e 5.55 de glicose, pH 7.2. O hipocampo e o

córtex foram dissecados em HBSS, foram obtidas fatias coronais de 400 μm utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. As fatias hipocâmpais e corticais foram separadas e transferidas para placas cultura com 24 poços contendo 500 μL de solução HBSS em cada poço e foram pré-incubadas por 15 minutos. A incubação ocorreu em 280 μL de solução HBSS seguindo pela adição de 20 μL de 0.33 e 0.165 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ L-[^3H] glutamato (PerkinElmer®) por fatia de hipocampo e córtex, respectivamente, cuja concentração final de glutamato por poço foi de 100 μM . Este procedimento foi realizado a 37°C com o tempo de incubação de 7 e 5 minutos para córtex e hipocampo respectivamente. A captação independente de sódio foi determinada utilizando N-metil-D-glucamina ao invés de cloreto de sódio. Esta captação inespecífica foi subtraída do total para obter a captação sódio dependente. Este procedimento foi realizado a aproximadamente 4°C. A captação foi interrompida após 7 e 5 minutos (córtex e hipocampo) por duas lavagens de 1.0 mL com HBSS gelado. Posteriormente, adicionou-se 200 μL e 300 μL de NaOH (0.5 N) em cada uma das fatias hipocâmpais e corticais, respectivamente. Alíquotas foram tomadas para a determinação do conteúdo intracelular de L-[^3H] glutamato por contagem de cintilação. A determinação de proteína foi determinada pelo método de Peterson (1977). O protocolo foi realizado de acordo com Thomazi et al., 2004.

2.3.2 Determinação do imunoconteúdo de GLUT1 por Western blot

O hipocampo foi rapidamente dissecado sobre o gelo e congelado a -70 °C. O processamento das amostras de hipocampo para obtenção do homogeneizados foi efetuado em tampão (NaF 50mM, Tris 20mM, sacarose 0.32mM, ortovanadato 1mM, EDTA mM, EGTA 1mM, fenilmetilsulfonil fluoride 1mM). Estes homogeneizados foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado. O total de proteínas foi determinado pelo método Peterson (1977). Para análise por Western blot, 30 μg de proteínas foram separadas por eletroforese em 8% de

gel de poliacrilamida e electrotransferida em membrana de PVDF. Os sítios de ligações não específicos foram bloqueados em Tween-Tris salina tamponada (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo NaCl 0,9% e 0,1% Tween-20), contendo 5% de albumina durante 2 horas. As membranas foram incubadas por uma noite a 4°C com anticorpo primário Anti-GLT1 (GLT1/EAAT2, Alpha Diagnostics Intl®), as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (GE Healthcare Life Sciences® - Anti-rabbit IgG) conjugado com peroxidase por 2 horas a temperatura ambiente ou 24 horas a 4°C.

A análise foi feita em um sistema de quimiluminescência (Amersham, São Paulo, Brasil). Os filmes (Kodak® T-Mat G/RA) foram digitalizados e a análise densitométrica foi realizada usando um programa de domínio público NIH desenvolvido em “*U.S. National Institutes of Health*” e disponível na internet no endereço <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. Como um controle adicional da carga protéica, as membranas foram coradas com Ponceau S. Os resultados foram apresentados como imunocnteúdo da razão proteínas analisadas pela proteína β -actina, que foi utilizada como controle de carga, utilizando anticorpo monoclonal primário Anti- β -Actina (Sigma, Aldrich®) e o anticorpo secundário (GE Healthcare Life Sciences® - Anti-mouse IgG). O protocolo foi realizado de acordo com Müller et al., 2010.

2.3.3 Teste de viabilidade celular – MTT

Para investigar a viabilidade celular foram realizados ensaios de MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil)-2, 5 difeniltetrazólio-tetrazol em fatias de hipocampo e córtex. Os animais foram decapitados 12 horas após a última administração do veículo ou DN, e os cérebros foram imediatamente removidos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ e 5.55 de glicose, pH 7.2. Do hipocampo e córtex dissecados em HBSS, foram obtidas fatias coronais de 400 μ m utilizando um fatiador de tecidos de

Mcllwain. Fatias hipocâmpais e corticais foram separadas e transferidas para placas de cultura com 24 poços contendo 500 µL de solução HBSS em cada poço e foram pré-incubadas por 15 min. A incubação ocorreu em 280 µL de solução HBSS seguido pela adição de 20 µL do reagente de MTT, numa concentração final de 0,5 mg/ml por fatia, durante 30 min. Cada grupo possuía fatias branco que foram incubadas em 250 µL de solução HBSS e 30 µL de TCA 10% (adicionado 10 minutos antes do MTT) e reagente de MTT na mesma concentração. Este procedimento foi realizado a 37°C e à meia luz.

Após a incubação o meio com MTT foi descartado, e à fatia adicionou-se 300 µL de DMSO, com a finalidade de realizar a extração do produto formazan, formado pela quebra do substrato por enzimas mitocondriais de células viáveis. Após 15 minutos sob agitação com DMSO, sempre protegido da luz, o meio corado em tom roxo foi retirado com pasteur de vidro, reservando-se uma alíquota de 200 µL que foi lida em espectrofotômetro em 560 e 650 nm em placa com 96 poços (Oliveira et al., 2002). Posteriormente, seguiu-se a dosagem de proteínas, que foi realizada pelo método de Peterson (1977).

2.4 Parâmetros Metabólicos

2.4.1 Coleta de sangue e obtenção do soro sanguíneo

A coleta de sangue foi realizada conforme o protocolo de Kazlauckas et al., 2011. A obtenção de soro sanguíneo foi realizada entre 10:00 am e 12:00 pm. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos para obtenção de soro. O soro foi congelado a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

2.4.2 Medida do Peso Corporal e dos Testículos

O monitoramento do peso corporal dos animais foi realizado através da uma balança de precisão da marca Bioprecisa® modelo BS3000A (com precisão 3000g/0.1g), na qual os

animais eram pesados no 1º, no 10º e 20º dias de tratamento crônico. E no 1º, 2º e 3º dias no tratamento subcrônico. O monitoramento do peso foi realizado entre as 12:00 pm e 2:00 pm.

A retirada e posterior pesagem dos testículos foram efetuadas após a eutanásia dos animais utilizando balança de precisão KERN®, modelo EG 220- 3NM. Esse procedimento foi realizado ao término do tratamento crônico de 20 dias. Para análise dos dados foi utilizada uma razão entre o peso dos testículos e o peso corporal dos animais, os dados entre os animais do grupo CO e do grupo DN são expressos em percentual. A retirada e a pesagem dos testículos foram realizadas conforme Heindel et al., 1989.

2.4.3 Teste de tolerância à glicose (TTG)

A sensibilidade periférica à insulina e o metabolismo da glicose foram avaliados através do TTG após 17 dias de tratamento. Uma injeção intraperitoneal (i.p) de glicose (2mg/g de peso corporal) foi feita após o jejum de 12 horas. O sangue foi coletado por uma pequena incisão na ponta da cauda nos seguintes tempos: 0 minutos (jejum) e nos tempos: 30, 60, 120 minutos após a injeção i.p de glicose. Os níveis de glicose foram mensurados através do glicosímetro (Accu Chek Active, Roche Diagnostics®, USA). O procedimento foi realizado entre 12:00 pm e 14:30 pm, conforme Müller et al., 2010.

2.4.4 Dosagens séricas

As dosagens foram realizadas no soro dos animais CO e DN para verificação dos níveis de ALT/TGP, AST/TGO, albumina, creatinina, uréia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol de LDL e triglicerídeos. Os procedimentos foram feitos de acordo com o fabricante, KATAL®, MG, Brasil.

2.4.4.1 Albumina

Método colorimétrico para a determinação da Albumina.

O método consiste na complexação da albumina com o corante verde de bromocresol em pH ácido que gera uma modificação na absorção espectral deste corante. A absorção do complexo ocorre na faixa de 630 nm e é proporcional à concentração de albumina na amostra.

2.4.4.2 *ALT/TGP e AST/TGO*

Foi utilizado um método cinético UV para a determinação destas enzimas.

No presente método, a ALT catalisa a transferência do grupo α -amino da alanina para o α -cetogluturato com formação de glutamato e piruvato. Este, sob a ação da desidrogenase láctica (LDH), é convertido em lactato. Simultaneamente, o NADH presente é oxidado a NAD⁺. A velocidade de diminuição da concentração de NADH no meio pode ser seguida espectrofotometricamente em 340 nm, sendo proporcional à concentração de ALT na amostra.

A AST catalisa a transferência do grupo α -amino do aspartato para o α -cetogluturato com formação de glutamato e oxalacetato. Este, sob a ação da malato desidrogenase é convertido a malato. Simultaneamente, o NADH presente é oxidado a NAD⁺. A velocidade de diminuição da concentração de NADH no meio pode ser seguida espectrofotometricamente em 340 nm, sendo proporcional à concentração de AST na amostra.

2.4.4.3 *Creatinina e Uréia*

A creatinina e outros cromogênios do soro reagem com o ácido pícrico em meio alcalino formando complexos corados com um máximo de absorção em 510 nm. Após a obtenção da absorbância, adiciona-se ao soro um acidificante que desfaz o complexo creatinina-picrato, deixando intactos os complexos cromogênios-picrato, cuja absorbância é então medida. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.

Numa variação especialmente útil em sistemas de automação, mede-se a velocidade de formação do picrato alcalino, constituindo-se, portanto em método cinético, sem a necessidade de acidificação e de obtenção de duas leituras espectrofotométricas. As leituras são obtidas nos minutos iniciais da reação, quando ainda não houve formação dos complexos cromogênios-picrato.

A uréia da amostra é hidrolisada pela enzima urease com produção de gás carbônico e íons amônio. Estes são captados por uma segunda enzima, a glutamato desidrogenase, que em presença de NADH e de α -cetoglutarato produz NAD⁺ e glutamato. A velocidade de desaparecimento do NADH no meio pode ser seguida espectrofotometricamente em 340 nm, sendo proporcional à concentração de uréia na amostra.

2.4.4.4 Colesterol Total e Frações

Colesterol Total

Método enzimático colorimétrico para a determinação do colesterol total. No presente método, os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença do colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado (quinoneimina) com máximo de absorção em 500 nm.

Colesterol HDL

O ensaio enzimático consiste em 2 reações distintas:

1. A eliminação de quilomicrons, Colesterol-VLDL e Colesterol-HDL pela colesterol esterase e pela colesterol oxidase e subseqüentemente pela catalase.
2. A medição específica do Colesterol HDL após a liberação do Colesterol HDL por detergentes no Reagente 2. A intensidade do corante quinoneimina produzido é diretamente proporcional à concentração de colesterol quando medida a 600 nm.

Colesterol LDL

Para a dosagem do colesterol LDL, o presente estudo utilizou a equação do artigo de Friedewald et al, 1972. Emprega-se a fórmula: **Colesterol LDL** = Colesterol Total - Colesterol HDL - TG/5. Essa formula só pode ser utilizados quando os valores TG é igual ou menor 400 mg/dl.

2.4.4.5 Triglicerídeos

Método enzimático colorimétrico para a determinação dos Triglicerídeos.

Os triglicerídeos do soro são hidrolisados pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela enzima glicerol cinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase e em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinoneimina), com máximo de absorção em 500 nm.

2.5 Análises estatísticas

Para tratamento estatístico dos resultados, foram utilizadas as técnicas de estatística descritiva: média, desvio-padrão, erro padrão e percentagem, além de ferramentas de estatística analítica: Análise de Variância e Teste T de *Student*, Correlação de *Pearson*, Teste de *Mann-Whitney* e Teste de *Wilcoxon*.

Para Teste de Comportamento de Agressividade (Teste do Intruso), as variáveis latência do primeiro ataque e número de ataques do residente, a análise estatística dos resultados procedeu-se com as técnicas de estatística descritiva: média, desvio-padrão, erro padrão e percentagem, e adicionalmente, ferramentas de estatística analítica: Análise de Variância (ANOVA não paramétrica; teste de *Kruskal-Wallis* seguido da análise do teste de

Dunn's) e Teste T de *Student* para amostras independentes nas variáveis: número de ataques e latência do primeiro ataque, no teste de agressividade (Teste do Intruso).

Para o teste de campo aberto e o teste de avaliação da memória espacial (Labirinto Aquático de Morris) foi utilizado o Teste T de *Student*. Para análise do teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado foi utilizado o teste *Mann-Whitney*. Para análise estatística dos parâmetros metabólicos, análise do peso corporal, teste de tolerância à glicose (TTG) e da razão corporal com o peso dos testículos, foi utilizado o Teste T de *Student* para amostras independentes.

Para análise neuroquímica: captação de glutamato, imunoconteúdo de GLUT1 por *Western Blot*, viabilidade mitocondrial MTT foi utilizado método estatístico teste T de *Student*.

A correlação de *Pearson* e critério de associação de *Pearson* foram utilizados para analisar o Índice de Agressividade; Teste de *Wilcoxon* (amostras dependentes) e Teste de *Mann-Whitney* (amostras independentes) para analisar diferenças na tarefa de memória aversiva. Para todas as análises estatísticas foi atribuída diferença estatística com um nível de significância quando $p < 0,05$. Nível de significância adotado no presente estudo $\alpha = 0,05$. Os programas empregados na análise foram: SPSS 15 for Windows®, Excel 2007 Microsoft Office® e GraphPad Prism 5®.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros Comportamentais

Os animais que receberam o tratamento subcrônico e crônico com DN foram submetidos às tarefas comportamentais descritas previamente, e a análise dos resultados obtidos seguiu de forma independente nestes dois grupos. Durante os testes comportamentais de labirinto aquático de *Morris*, esQUIVA inibitória passiva, os animais continuavam recebendo

o DN e o veículo. A administração era feita após a sessão do teste comportamental para a manutenção dos níveis sistêmicos do DN.

3.1.1 Locomoção espontânea e exploração no campo aberto - tratamento subcrônico

Os resultados demonstram que o tratamento subcrônico não altera a atividade locomotora e exploratória dos animais, uma vez que não houve diferenças significantes entre os animais do grupo DN (n=18) e os animais do grupo CO (n=18) (**Figura 4**).

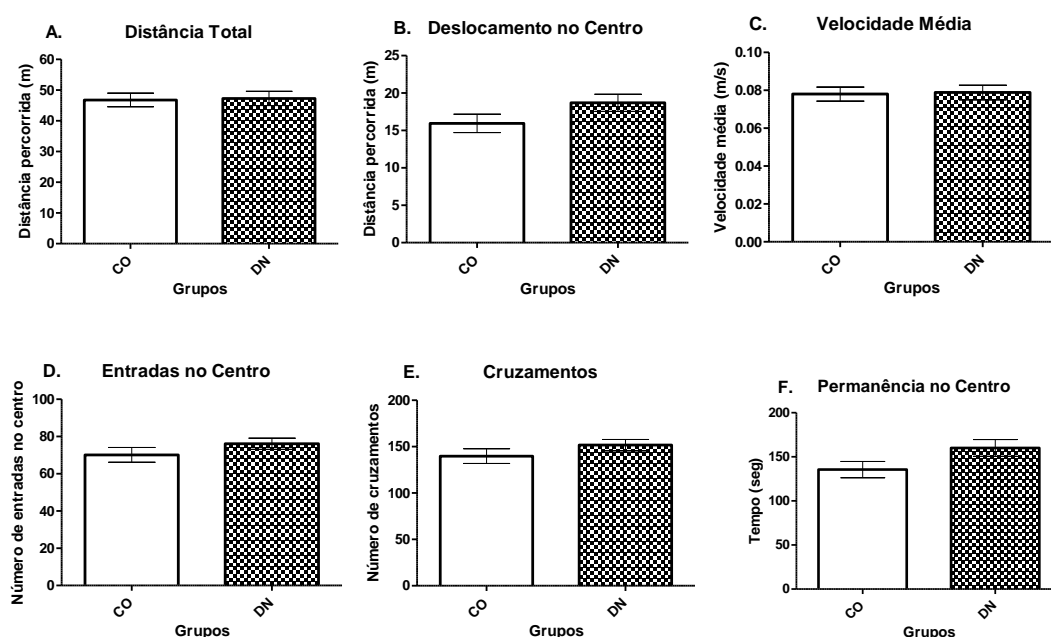


Fig. 4 - Gráficos obtidos da análise no aparato campo aberto, tratamento subcrônico. Distância total percorrida no aparato (A), distância percorrida no centro do aparato (B), velocidade média (m/seg) (C), números de entradas no centro do aparato (D), número de cruzamentos entre a periferia e o centro do aparato (E) e tempo de permanência no centro do aparato (F). Os resultados estão expressos como média e erro padrão, n= 18 por grupo.

3.1.2 Locomoção espontânea e exploração no campo aberto - tratamento crônico

Os resultados do tratamento crônico não revelaram diferenças significativas entre os animais do grupo DN (n=24) comparados com o grupo CO (n=24) nas variáveis: distância total percorrida no aparato, velocidade média (m/s), tempo de permanência no centro do aparato (segundos) (**Figura 5**).

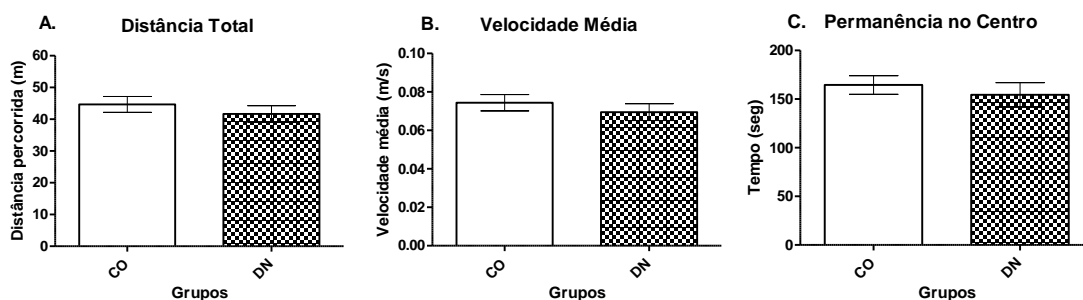


Fig. 5 - Gráficos obtidos da análise no aparato campo aberto, tratamento crônico. Distância total percorrida (m) (A), velocidade média (B) e tempo de permanência no centro do aparato (C). Os resultados estão expressos como média e erro padrão, n= 24 por grupo.

No entanto, o grupo DN diminuiu significativamente o número de entradas no centro do aparato ($p < 0,05$), o tempo de mobilidade no centro do aparato ($p < 0,05$), o número de cruzamentos entre a periferia e o centro do aparato ($p < 0,05$), assim como a distância total percorrida no centro do aparato quando comparado com o grupo CO ($p < 0,05$) (**Figura 6**).

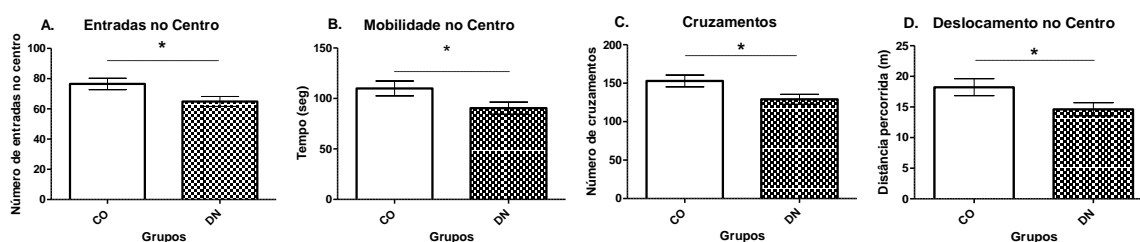


Fig. 6 - Gráficos obtidos da análise no aparato campo aberto, tratamento crônico. Número de entradas no centro do aparato (A), Tempo de mobilidade no centro do aparato (B), Número de cruzamentos entre a periferia e o centro do aparato (C) e distância percorrida no centro do aparato (D). Os resultados estão expressos como média e erro padrão, n= 24 por grupo, * $p < 0,05$.

3.1.3 Avaliação do comportamento agressivo - Teste do Intruso

O tempo de latência do primeiro ataque dos animais residentes ao intruso no grupo DN foi significativamente menor a partir do 16º dia de tratamento quando comparado ao grupo CO ($p < 0,05$). A latência para o primeiro ataque foi ainda menor após 18 dias de tratamento ($p < 0,001$). Ao 3º, 8º, 10º dia de tratamento não houve diferença estatística entre os grupos DN e CO. Após 2 dias de interrupção do tratamento crônico (23 dias) não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos DN e CO (**Figura 7**).

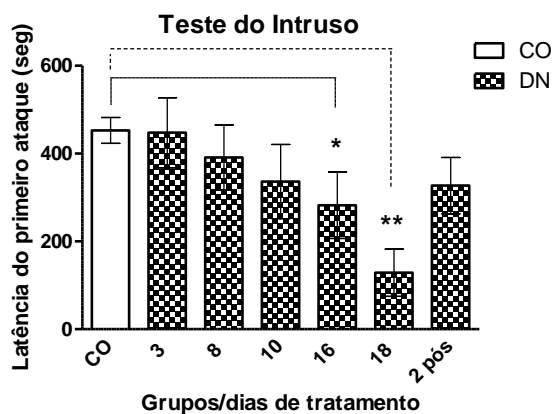


Fig. 7 - Gráfico obtido da análise da agressividade (Teste de Intruso).

Latência do primeiro ataque o grupo DN em seus respectivos tempos de tratamento: 3°, 8°, 10°, 16°, 18° dia de tratamento e 2 dias após a suspensão do DN administrado por 20 dias (n=10 por subgrupo). O grupo CO foi testado pareado com grupo DN nos dias do teste, porém foi expressos em uma única coluna (n=60). Os resultados estão expressos em média e erro padrão, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Em relação ao número de ataques feitos pelos animais residentes aos animais intrusos, os animais do grupo DN apresentaram um aumento no número de ataques em relação os animais do grupo CO no 18° dia de tratamento ($p=0,02$). Ao 3°, 8°, 10° e 16° dia de tratamento não houve diferença estatística entre os grupos CO e DN. Também não houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos após a suspensão do tratamento por 2 dias (23 dias), (**Figura 8**).

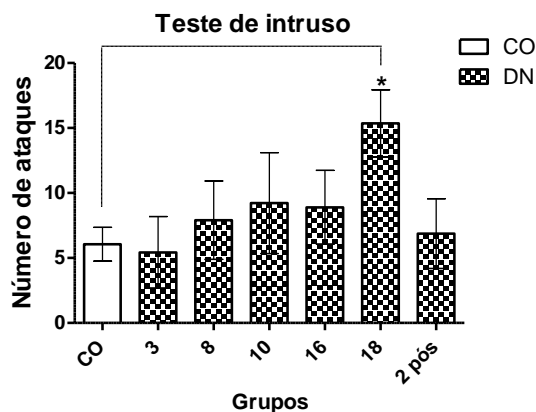


Fig. 8 - Gráfico obtido da análise da agressividade (Teste de Intruso).

O grupo DN em seu respectivo tempos de tratamento: 3°, 8°, 10°, 16°, 18° dia de tratamento e 2 dias após 20 dias de tratamento. O grupo CO foi testado pareado com grupo DN, n=60. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=10 por subgrupo, * $p < 0,05$.

A partir destes dados foi elaborado um índice que representa a postura do animal conforme o caráter dominante, neutro e subordinado denominado de Índice de Agressividade (IA).

As análises comparativas dos resultados estão apresentadas na **Tabela 1**. O critério de associação de Pearson (r_A) demonstrou que o índice de agressividade dos animais do grupo DN é significativamente maior que dos animais do grupo CO ($r_A = 0,313$; $\chi^2 = 9,8$; $p < 0,01$).

Os resultados também demonstram que após a suspensão do tratamento (20 DN + 2 dias sem DN) o efeito do DN ainda permanece (IA = 0,75).

TABELA 1 - Índice de agressividade dos animais dos grupos CO e DN.

CO 1	Experimental (DN)					CO 2	Experimental
Dias da coleta dos dados							
Dias de tratamento							
0 CO	3 DN	8 DN	10 DN	16 DN	18 DN	19 CO	20DN+2 s/DN
N 30	10	10	10	10	10	30	8
Na 11	5	5	6	7	8	11	6
Ns 4	1	0	0	0	0	5	0
Nn 15	4	5	4	3	2	14	2
IA 0,23	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,20	0,75

n – número de animais.

Na – número de agressores.

Ns – número de submissos.

Nn – número de neutros.

IA – índice de agressividade. $IA = (Na - Ns)/n$

3.1.4 Teste da memória aversiva – tratamento crônico

Não houve diferenças estatisticamente significativas na memória de curta e longa duração entre os grupos CO e DN (**Figura 9 A e B**). O desempenho do grupo CO na memória de curta e longa duração melhorou quando comparados ao seu treino ($p < 0,05$). No grupo DN a memória de longa duração melhorou ($p < 0,05$), enquanto que o desempenho na memória de curta duração não foi estatisticamente diferente do seu treino.

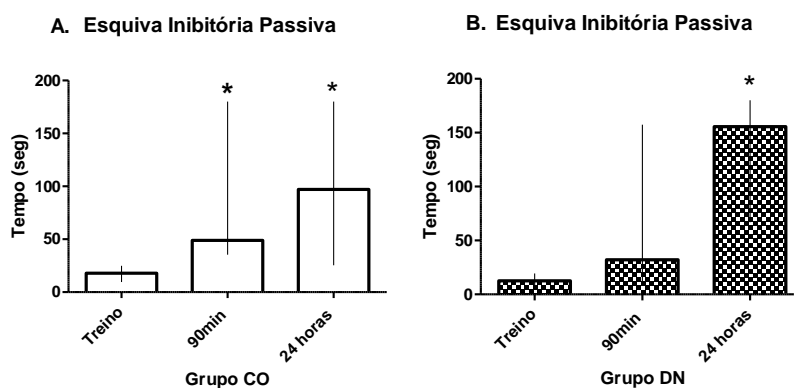


Fig. 9 - Memória aversiva no aparato esquiva inibitória passiva - Tratamento crônico. Tempo de latência para descida da plataforma durante o treino, 90 minutos após o treino (memória de curta duração) e 24 h após o treino

(memória de longa duração). O grupo CO (A) e o grupo DN (B) respectivamente, os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil; n=18 por grupo, *p< 0,05.

3.1.5 Teste de memória espacial – tratamento subcrônico

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos CO e DN nos dias de treino (fase de aquisição). Na fase de evocação da memória (teste), a distância percorrida e a velocidade média foram significativamente maiores (p<0,05) no grupo DN comparado com o grupo CO (Figura 10 A, B e C).

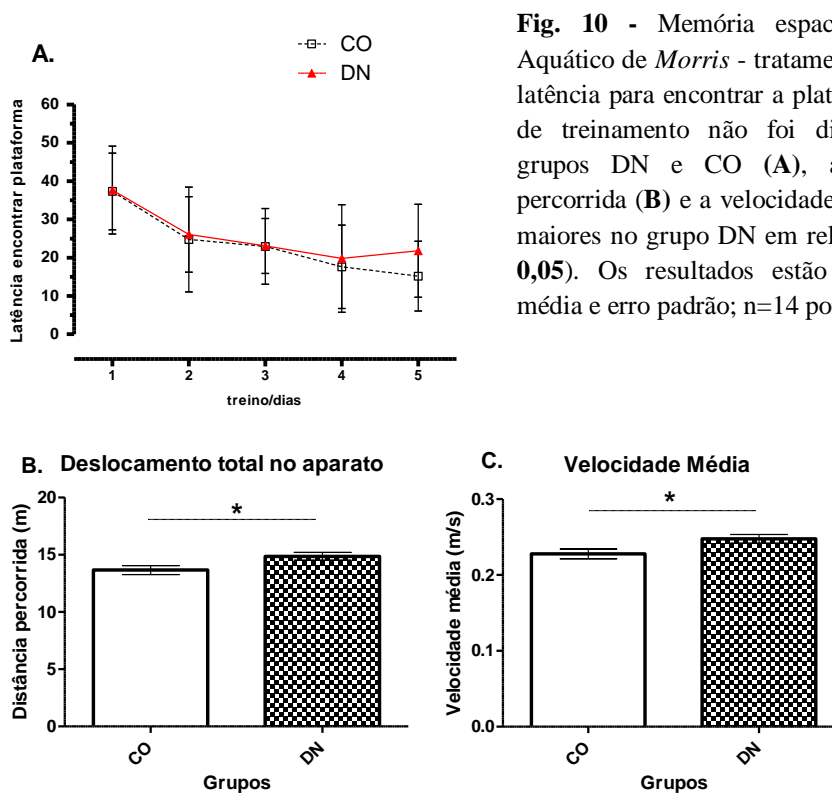


Fig. 10 - Memória espacial no Labirinto Aquático de *Morris* - tratamento subcrônico. A latência para encontrar a plataforma nos 5 dias de treinamento não foi diferente entre os grupos DN e CO (A), a distância total percorrida (B) e a velocidade média (C) foram maiores no grupo DN em relação ao CO (*p< 0,05). Os resultados estão expressos como média e erro padrão; n=14 por grupo.

As demais variáveis analisadas na fase do teste: número de entradas, tempo permanência e distância percorrida no quadrante alvo; latência de entrada e número de entradas na região da plataforma, assim como o número de entradas, tempo de permanência e distância percorrida no quadrante oposto não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos CO e DN (Figura 11).

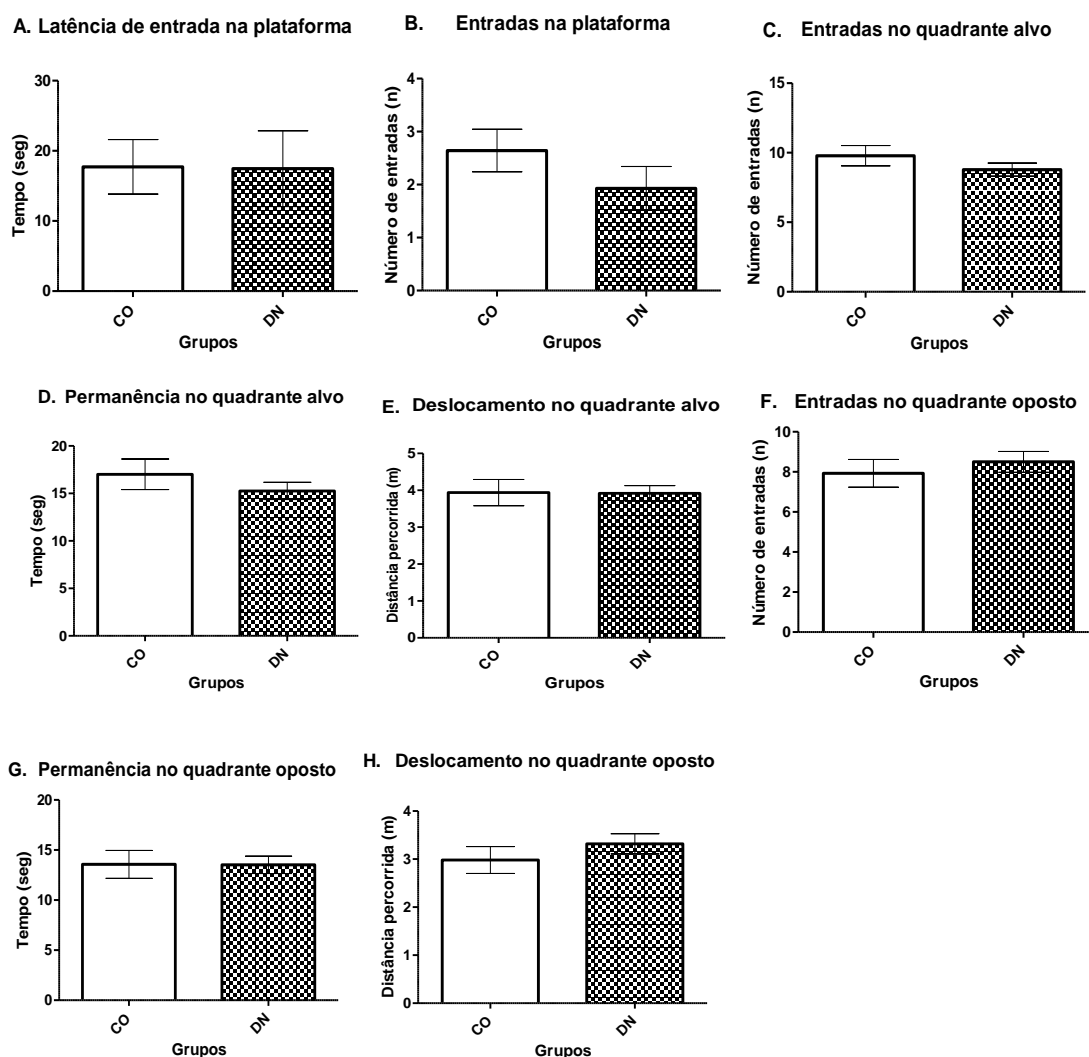


Fig. 11 - Memória espacial no labirinto aquático de *Morris*, tratamento subcrônico. Latência da primeira entrada na plataforma (A), número de entradas na plataforma (B), número de entradas no quadrante alvo (C), tempo de permanência no quadrante alvo (D), distância total percorrida no quadrante alvo (E), número de entradas no quadrante oposto (F), tempo de permanência no quadrante oposto (G) e distância total percorrida no quadrante oposto (H) os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=14 por grupo.

3.1.6 Teste de memória espacial – tratamento crônico

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os animais dos grupos CO e DN nos 5 dias de treino (Figura 12).

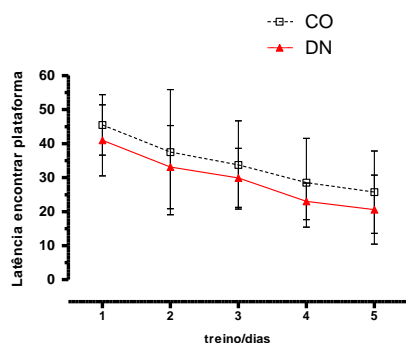


Fig. 12 - Memória espacial no aparato labirinto aquático de *Morris*- tratamento crônico. Os resultados estão expressos em média com desvio padrão n=16 por grupo.

No teste (evocação da memória), não houve diferenças significativas entre os grupos CO e DN na latência de entrada no local da plataforma, no número de entradas na região da plataforma, na distância total percorrida no aparato ou na velocidade média (**Figura 13**).

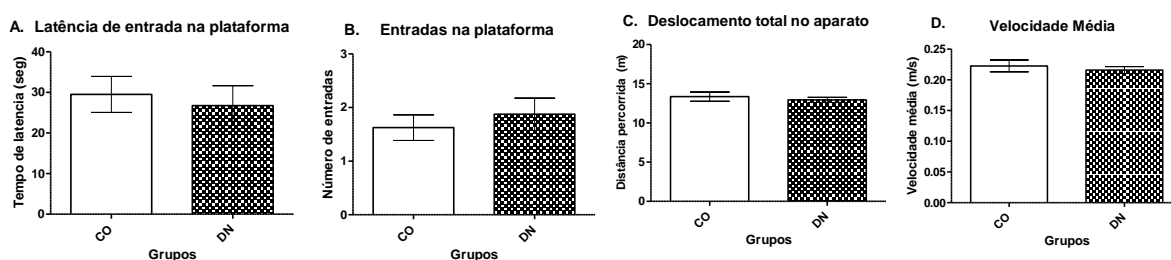


Fig. 13 - Memória espacial no aparato labirinto aquático de *Morris* - tratamento crônico. Latência da primeira entrada na plataforma (**A**), Número de entradas na plataforma (**B**), Distância total percorrida no aparato (**C**), velocidade média (m/s) (**D**) Os resultados estão expressos em média e erro padrão primeira entrada na plataforma média e erro padrão, n=16 por grupo.

Por outro lado os animais do grupo DN diminuíram a distância percorrida no quadrante alvo, sem alterar o número de entradas ou tempo de permanência no mesmo quando comparados ao grupo CO (**Figura 14**).

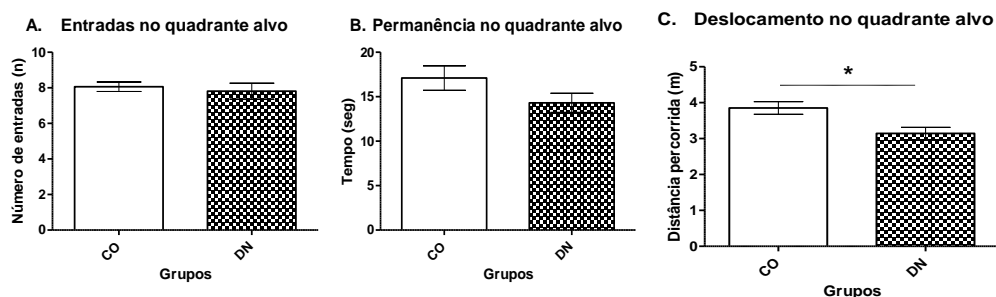


Fig. 14 - Memória espacial no aparato labirinto aquático de *Morris* - tratamento crônico. Número de entradas no quadrante alvo (**A**), tempo de permanência no quadrante alvo (**B**) e distância percorrida no quadrante alvo (**C**). Os resultados estão expressos em media com erro padrão n=16 por grupo, * $p < 0,05$.

Em relação às variáveis associadas ao quadrante oposto como o número de entrada, o tempo de permanência e a distância percorrida dentro do quadrante, não houve diferença estatística entre os grupos (**Figura 15**).

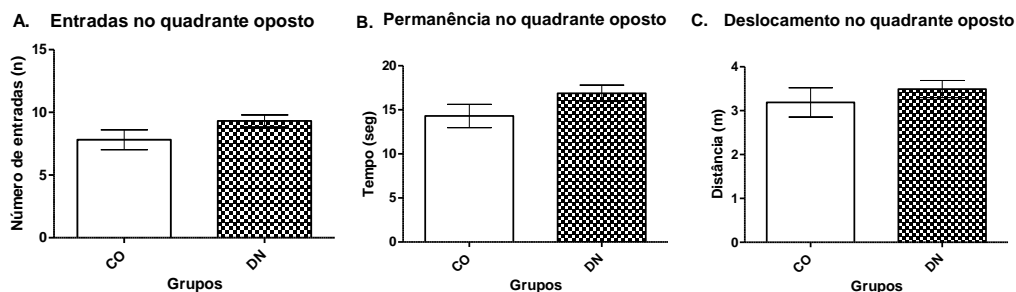


Fig. 15 - Memória espacial no aparato labirinto aquático de *Morris*, no tratamento crônico. Número de entradas no quadrante oposto (**A**), tempo de permanência no quadrante oposto (**B**), distância no quadrante oposto (**C**). Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=16 por grupo.

3.1.7 Avaliação da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado - tratamento crônico

A mensuração do comportamento de ansiedade não demonstrou diferenças estatisticamente significativas nas variáveis como tempo de permanência nos braços abertos, número de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados entre os animais do grupo CO e os animais do grupo DN (**Figura 16**). Também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao número de *rearings* (atividade exploratória vertical) e número de bolos fecais (dados não demonstrados).

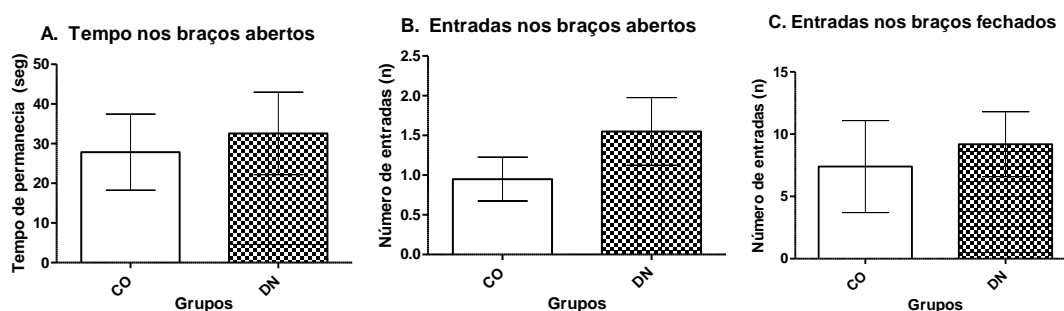


Fig. 16 - Ansiedade no aparato labirinto em cruz elevado - Tratamento crônico. Tempo de permanência nos braços abertos do aparato (**A**), número de entradas nos braços abertos (**B**) e número de entradas nos braços fechados (**C**). Os resultados estão expressos em média com erro padrão, n=20 por grupo.

3.2 Parâmetros Neuroquímicos

3.2.1 Captação de Glutamato

No tratamento subcrônico não houve alteração significativa na captação de glutamato em fatias hipocâmpais e corticais. Entretanto, o tratamento crônico com DN reduziu significativamente ($p < 0,05$) o percentual da captação de glutamato nas fatias de hipocampo e do córtex (**Figura 17 e 18**).

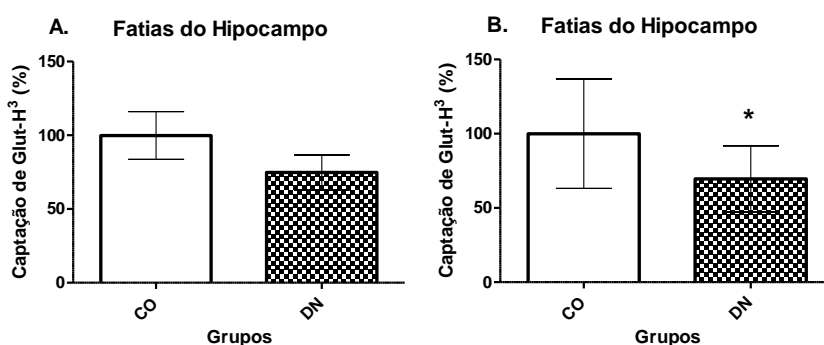


Fig. 17 - Captação de glutamato em fatias de hipocampo, tratamento subcrônico (A) e tratamento crônico (B). Os resultados estão expressos em percentual (%) da captação de glutamato, com média e desvio padrão, $n=7$ por grupo * $p < 0,05$.

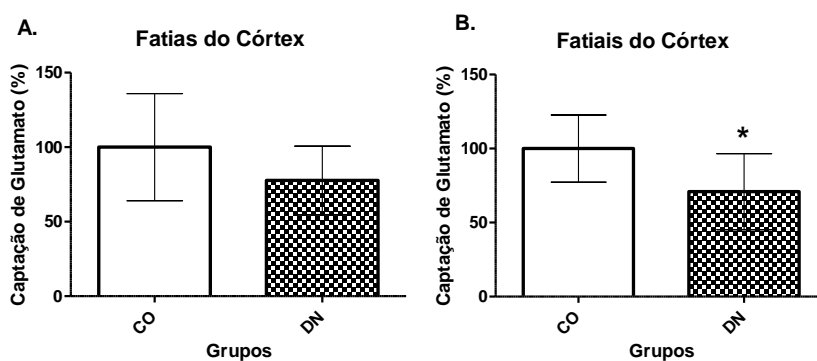


Fig. 18 - Captação de glutamato em fatias de córtex, tratamento subcrônico (A) e tratamento crônico (B). Os resultados estão expressos em percentual (%) da captação de glutamato, com média e desvio padrão, $n=7$ por grupo, * $p < 0,05$.

3.2.2 Determinação do imunoconteúdo de GLT-1

O tratamento subcrônico não demonstrou diferenças estatísticas significativas na quantidade do transportador astrocitário de glutamato majoritário, GLT-1, em hipocampo, no grupo DN comparado com grupo CO. Todavia, houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) deste transportador decorrente do tratamento crônico com DN (**Figura 19 A e B**).

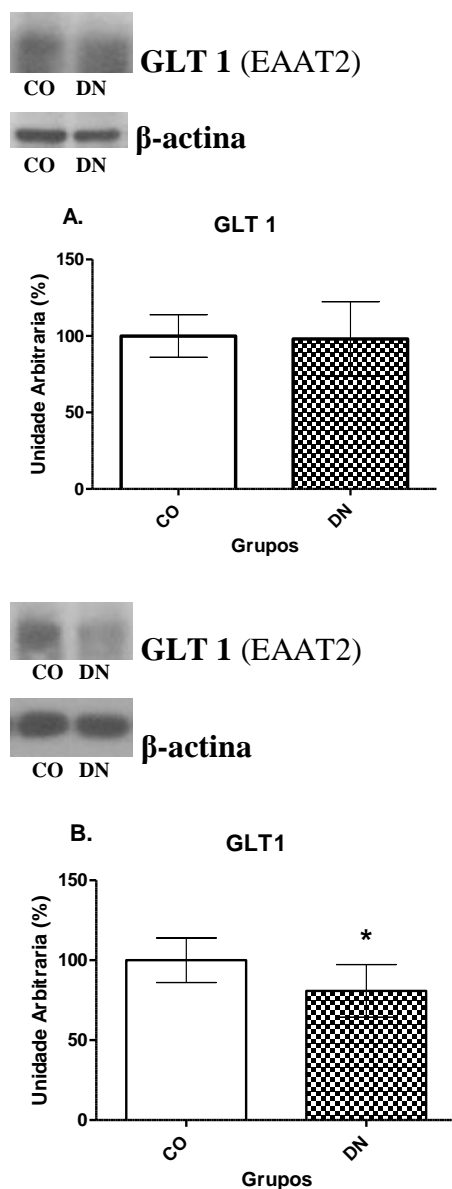


Fig. 19 - Imunoconteúdo do transportador de glutamato GLT1 por *Western Blot* em homogeneizado de hipocampo. Tratamento subcrônico (A), tratamento crônico (B) os resultados estão expressos em percentual (%), com média e desvio padrão, $n=8$ por grupo.

3.2.3 Teste de viabilidade celular – MTT

O tratamento com DN não alterou significativamente a viabilidade mitocondrial em fatias hipocampais e corticais em relação ao grupo CO nos tratamentos subcrônico e crônico (Figura 20 e Figura 21).

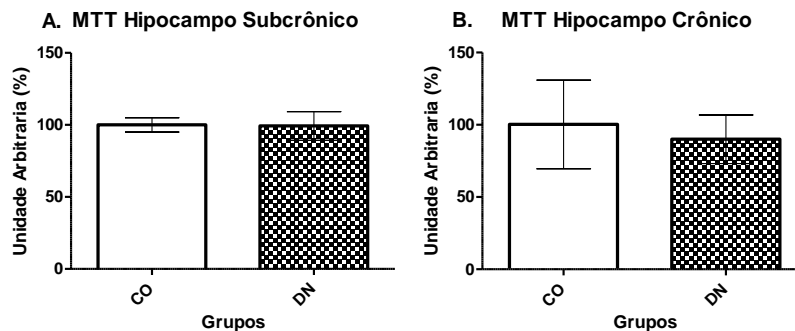


Fig. 20 - Gráficos obtidos da análise do teste de viabilidade mitocondrial (MTT) em fatias do hipocampo. Tratamento subcrônico (A), tratamento crônico (B). Os resultados estão expressos em percentual (%), com média e desvio padrão, n=4 por grupo.

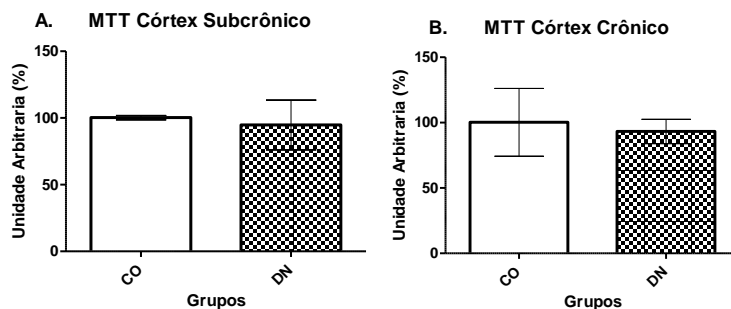


Fig. 21 - Gráficos obtidos da análise do teste de viabilidade mitocondrial (MTT) em fatias do córtex. Tratamento subcrônico (A), tratamento crônico (B). Os resultados estão expressos em percentual (%), com média e desvio padrão, n=4 por grupo.

3.3 Parâmetros Metabólicos

3.3.1 Medida do peso corporal

Durante o tratamento subcrônico o peso corporal dos animais foi monitorado diariamente. No tratamento crônico, o peso corporal foi mensurado no primeiro dia, décimo

dia e vigésimo dia. Os dois protocolos de tratamento não demonstraram alterar significativamente o peso dos animais nos grupos CO e DN (**Figura 22 A e B**).

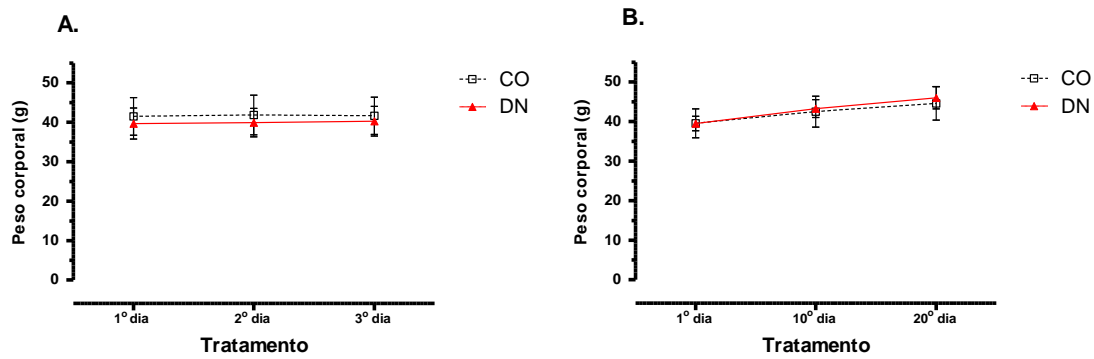


Fig. 22 - Gráficos obtidos da análise do peso corporal ao longo do tratamento subcrônico (**A**), e tratamento crônico (**B**). Os resultados estão expressos em média com desvio padrão, n=22 por grupo.

3.3.2 Mensuração do peso dos testículos

O resultado do peso dos testículos, expresso em percentual (%) da razão entre o peso corporal e o peso dos ambos os testículos dos animais, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos CO e DN. O tratamento crônico diminuiu o peso dos testículos do grupo DN em relação aos animais do grupo CO (**Figura 23**).

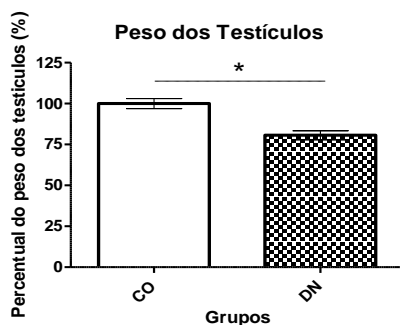


Fig. 23 - Peso dos testículos - tratamento crônico. Os resultados são a razão do peso testículos e o peso corporal, estão expressos com média com erro padrão, n=17 por grupo, * $p < 0,0001$.

3.3.3 Dosagens séricas

Teste de tolerância à glicose (TTG)

No teste de tolerância à glicose TTG os animais do grupo DN não apresentaram diferença estatística em relação os animais do grupo CO, n=13 por grupo (**Figura 24**).

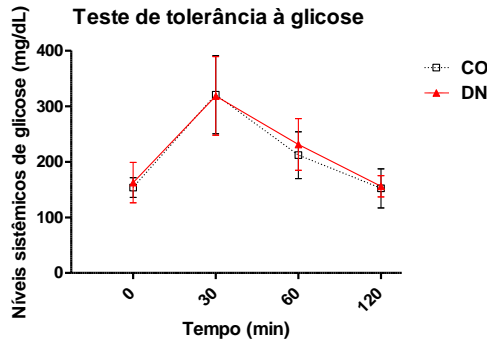


Fig. 24 - Teste de tolerância à glicose nos tempos 0, 30, 60, 120 minutos após a injeção i.p de glicose. Os resultados estão expressos com média com erro padrão, n=13 por grupo, tratamento crônico.

Os resultados das dosagens sistêmicas de albumina, creatinina, ALT/TGP, AST/TGO e uréia não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os animais dos grupos CO e DN durante o tratamento crônico (**Figura 25**).

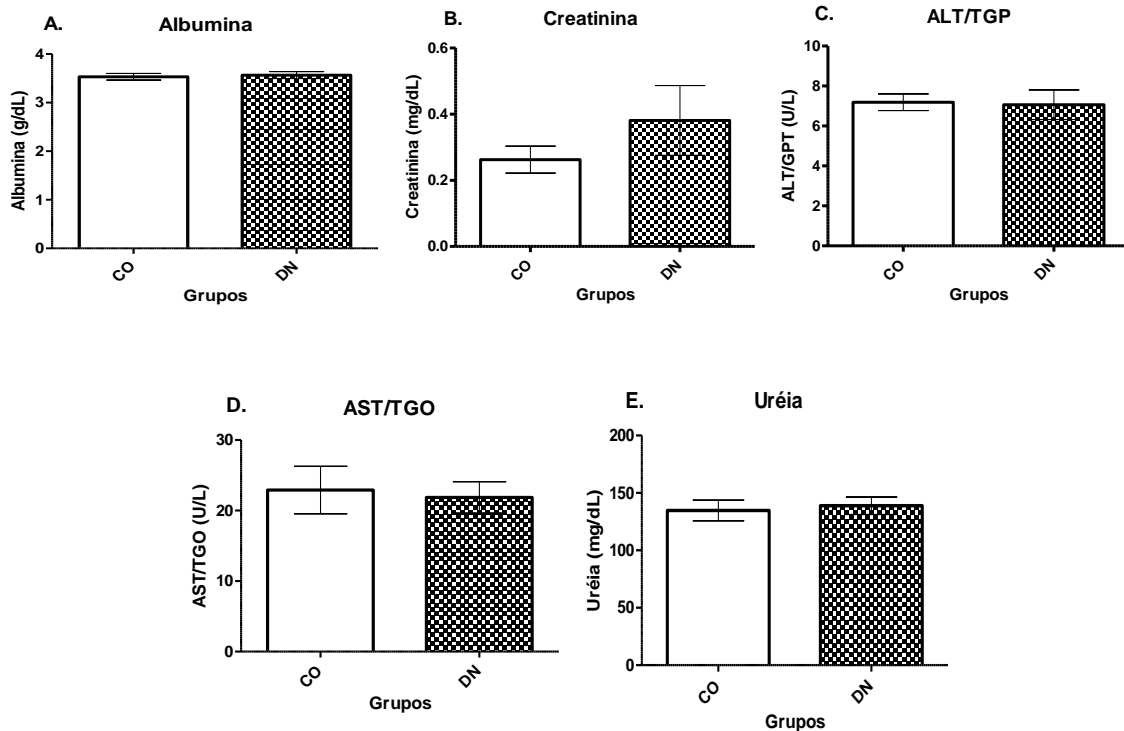


Fig. 25 - Níveis sistêmicos de albumina (A), creatinina (B), ALT/TGP (C), AST/TGO (D) e uréia (E). Os resultados estão expressos com média com erro padrão, n=10 por grupo, tratamento crônico.

Todavia, os níveis de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos animais do grupo DN quando comparados ao grupo CO. Não alterando estatisticamente significativo o colesterol LDL no grupo DN quando comparado ao grupo CO (**Figura 26**).

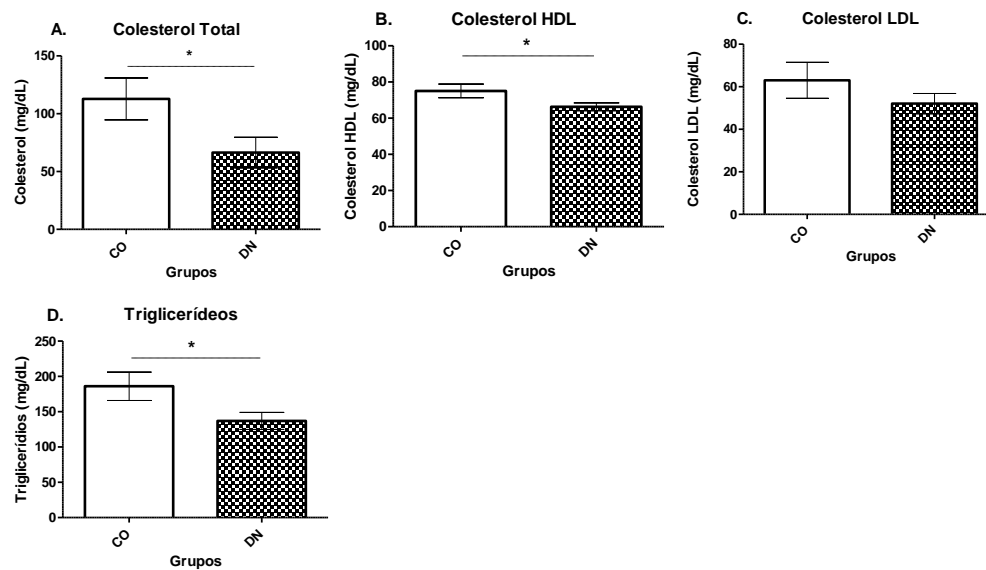


Fig. 26 - Gráficos obtidos da análise dos níveis sistêmicos de colesterol HDL (A), colesterol total (B), colesterol LDL (C) e triglicerídeos (D). Os resultados expressos com média com erro padrão, $n=10$ por grupo, tratamento crônico, * $p < 0,05$.

PARTE III

4. DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros Comportamentais

No parâmetro comportamental que avalia a locomoção espontânea em Campo Aberto, os animais com o tratamento subcrônico não demonstraram diferenças significativas em nenhuma das variáveis avaliadas entre os grupos CO e DN. No tratamento crônico os animais do grupo DN também não apresentaram diferenças na locomoção espontânea. Estes resultados estão de acordo com muitos estudos, que sugerem que o tratamento com EAA não altera a atividade locomotora espontânea (Bing et al., 1998; Bitran et al., 1993; Bronson, 1996; Clark & Fast, 1996; Clark & Harrold, 1997; Clark, Harrold & Fast, 1997; Martínez-Sanchis et al., 1996; Martínez-Sanchis et al., 2002; Minkin, Meyer & Van Haaren, 1993). Entretanto, nós adicionalmente demonstramos que os animais tratados com DN apresentaram uma diminuição no número de entradas e distância percorrida no quadrante central do campo aberto quando comparado ao grupo CO. Esses parâmetros sugerem que esse prejuízo na exploração dos animais tratados com DN poderia estar relacionado ao aumento da ansiedade, uma vez que os animais ansiosos tendem a explorar mais a periferia do campo aberto (Ramos, 2008).

Apesar de o Campo Aberto ser empregado para avaliar o comportamento de ansiedade através da observação da exploração do animal no centro e na periferia do aparato, o estudo de Ramos, 2008 relata que há necessidade de múltiplos testes comportamentais como o teste de claro escuro e labirinto em cruz elevado para um melhor entendimento do mecanismo do comportamento emocional em roedores (Ramos, 2008). Desta forma, os animais foram submetidos à tarefa labirinto em cruz elevado, na qual não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados. Dessa forma, a alteração observada no comportamento explorador dos animais, aparentemente não se relaciona com aumento da ansiedade.

No teste para avaliação de ansiedade do tratamento crônico, realizado no labirinto em cruz elevado, os resultados do presente trabalho não demonstram diferenças entre o grupo DN e CO. Logo, no presente trabalho a administração de EAA em camundongos, não apresentaram efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos, diferente do que se propunha no trabalho de Kouvelas et al., 2008, que tratou ratos *Wistar* com DN na dose 15mg/kg (s.c) por 6 semanas diariamente. O estudo de Bing et al., 1998 também demonstrou um efeito ansiolítico em ratos *Wistar* causado por uma única injeção de T (5mg/kg), testados no teste conflito de *Vogel's*, 24 horas depois da administração do fármaco. Ao contrário, no estudo de Minkin, Meyer & Van Haaren, 1993 o tratamento com DN (10 ou 50mg/semana por 8 semanas) em ratos *Long-Evans*, demonstrou um aumento no tempo de permanência dos animais na periferia do campo aberto, indicando um aumento de ansiedade. Isso poderia ser justificado devido à diferença entre as espécies estudadas. Em resumo, os efeitos dos EAA na ansiedade necessitam de uma caracterização mais precisa (Clark & Henderson, 2003).

Em roedores, a agressividade pode ser mensurada pela observação da quantidade e qualidade dos atos agressivos despendidos pelo macho residente contra o macho intruso (Clark & Henderson, 2003; McGinnis, 2004). Nós demonstramos que no teste de agressividade realizado através do teste de intruso, os animais do grupo DN apresentaram diminuição na latência do primeiro ataque no 16^o dia e no 18^o dia de tratamento. Isto sugere que os animais ficaram mais impulsivos quanto maior o tempo de tratamento. Aliado a isto, no 18^o dia de tratamento os animais do grupo DN apresentaram aumento no número de ataques inferidos aos animais intrusos quando comparados com os animais do grupo CO. Portanto, neste trabalho o tratamento prolongado com DN faz com que os animais tornem-se mais agressivos. Quanto à postura dos animais tratados com DN, observou-se uma mudança da postura submissa e neutra para uma postura dominante que foi dependente do tempo de

tratamento e se manteve até dois dias após a interrupção do tratamento com DN (Índice de Agressividade).

O estudo de Lumia et al., 1994, demonstrou que o tratamento por 10 semanas com T (1mg/rato, 3 vezes por semana), em machos *Long-Evans*, aumentou a postura dominante e reduziu a postura submissa quando comparados com os ratos controles. Por outro lado, Breuer et al., 2001, administrou propionato de T, DN e estanozolol em ratos *Long-Evans* (5mg/kg, 5 vezes por semana durante 12 semanas). O comportamento agressivo aumentou significativamente no grupo tratado com propionato de T quando comparado com o grupo controle; o grupo tratado com DN e o grupo controle demonstraram níveis similares de agressividade. Surpreendentemente, o grupo tratado com estanozolol exibiu níveis significativamente menores de agressividade que os grupos T e DN, e da mesma maneira quando comparado ao controle. Este efeito paradoxal do estanozolol em abolir o comportamento agressivo foi atribuído aos diferentes mecanismos de ação envolvendo alvos celulares e moleculares dos EAA no SNC. O estudo de McGinnis et al., 2002 demonstrou que o tratamento com propionato de T associado a provocação física nos animais (através da puxada de cauda, "tail pinch") aumentou a agressividade de roedores. Os autores deste trabalho especulam que o propionato de T sensibiliza o animal para inferir os ataques ao animal intruso e estimula a agressividade. Os resultados de Breuer, McGinnis & Lumia, 2001 sugerem uma ausência de efeitos de DN sobre a agressividade e uma supressão do comportamento agressivo em roedores machos tratados com estanozolol.

Em contrapartida, o estudo de Long et al., 1996 demonstrou que ratos *Sprague-Dawley* que receberam DN (2mg/dia/rato ou 20mg/semana/rato, durante 4 semanas) apresentaram altos níveis de agressividade quando comparados ao grupo controle. Usando teste de competição para ingestão da água como medida de agressividade, ratos machos tratados com DN demonstraram dominância diante do acesso ao bebedouro em relação ao

grupo CO (Lindqvist et al., 2002). O estudo de Farrell & McGinnis, 2003 demonstrou que a provocação física estimula a agressividade em ratos tratados com T, DN e estanozolol, sendo significativamente diferente do grupo controle. Todavia, na ausência de provocação física os animais tratados com EAA não demonstraram comportamento agressivo em nem um dos três grupos, quando comparados ao grupo CO (McGinnis et al., 2002). A maior parte dos estudos que avaliam os efeitos da T demonstram que a mesma causa alterações sobre a interação social no que diz respeito ao comportamento sexual e agressivo (Clark et al., 1997; McGinnis, 2004; Salas-Ramirez, Montalto & Sisk, 2010). Porém, estes efeitos são de natureza contraditória por ser dependente do tipo de andrógeno, dose administrada, tempo de tratamento e idade/sexo do animal (Clark & Henderson, 2003).

Em resumo, os efeitos dos EAA sobre a agressividade são dependentes do tipo de composto, da espécie estudada, como do gênero dos animais. A administração do propionato de T em doses supra-fisiológicas por longo período de tempo aumenta o comportamento agressivo em ratos machos não castrados. A provocação física aumenta esse comportamento agressivo em contexto social e ambiental não provocando esse comportamento em animais controles. O estanozolol, por exemplo, não estimula a agressividade, ou às vezes, até atenua (Clark & Henderson, 2003). Este conjunto de resultados sugere que o DN e outros EAA podem aumentar o comportamento agressivo sobre condições que ainda não são bem compreendidas, assim novos estudos podem auxiliar no entendimento da neurobiologia do comportamento agressivo associado ao uso de EAA (McGinnis, 2004).

Em humanos, o uso indiscriminado dos EAA está associado a comportamentos como agressividade e violência sem provocação. O uso crônico intensifica a agressividade, principalmente por intermédio de agressão verbal, provocação para o combate/briga e aumento da violência contra a mulher. Esta forma de administração também contribui para a elevação dos níveis de homicídios praticados por adolescentes. Os usuários adolescentes são

mais suscetíveis a atos de violência, impaciência/impulsividade e irritabilidade, e tais efeitos se correlacionam positivamente com níveis séricos de T (McGinnis, 2004; Brooks & Reddon, 1996). Em controvérsia, alguns estudos não demonstraram evidências do aumento da agressividade em indivíduos saudáveis quando administradas doses elevadas de EAA (Tricker et al., 1996; Wang et al., 1996).

No teste de memória aversiva na Esquiva Inibitória Passiva os resultados não demonstraram diferenças estatísticas entre os animais dos grupos CO e DN. Todavia, entre os animais do grupo DN observou-se prejuízo no aprendizado da memória de curta duração (90 minutos após o treino). Sabe-se que os EAA exercem seus efeitos sobre o SNC através da sua interação com RA. Estudos em modelo animal demonstram que o cérebro apresenta alta densidade de RA no hipotálamo, uma importante região para influências androgênicas devido à secreção de gonadotrofina e, portanto, estreitamente ligada ao comportamento reprodutivo (Handa, Reid & Resko, 1986). Além desta região, altos níveis de RA estão localizados no córtex e no hipocampo, indicando que os RA estão envolvidos em uma variedade de funções das células neurais que incluem influências na memória e aprendizado (Simerly et al., 1990). Assim pode-se sugerir que mecanismos de formação da memória aversiva de curta duração são afetados pelo tratamento crônico o DN (Clark, Mitre & Brinck-Johnsen, 1996; Menard & Harlan, 1993; Izquierdo et al., 2006).

No teste de Labirinto Aquático de *Morris*, na fase de aquisição (treino) os animais dos grupos CO e DN não apresentaram diferenças nos 5 dias de treinamento em ambos os tratamentos; subcrônico e crônico. Na fase de evocação (teste) os animais do tratamento subcrônico não apresentaram nenhum efeito sobre a memória espacial, entretanto os animais tratados com DN demonstraram serem mais ativos devido à maior velocidade média e distância total percorrida no aparato em 60 segundos. No tratamento crônico os animais do grupo DN apresentaram sutis efeitos deletérios sobre a memória espacial demonstrados pela

menor distância (18,44%) percorrida no quadrante alvo comparado com os animais do grupo CO. Em contrapartida, o estudo Magnusson et al., 2009 relatou prejuízos na memória espacial em ratos tratados com DN na dose 15mg/kg tanto nos dias de treino (fase da consolidação), quanto no dia do teste (fase da evocação).

4.2 Parâmetros Neuroquímicos

O estudo de Parducz et al., 2006 afirma que os andrógenos possuem ações sobre a morfologia e funcionalidade do hipocampo. Os resultados da captação de glutamato radioativo por fatias hipocâmpais e corticais demonstram que o tratamento crônico com DN causa diminuição do transporte de glutamato, levando a alterações do tônus glutamatérgico intra e extracelular. Tais alterações resultam em um aumento da concentração de glutamato na sinapse, com conseqüente hiperestimulação glutamatérgica. Corroborando com este dado, na técnica de *Western Blot*, demonstrou-se diminuição do imunoconteúdo dos transportadores GLT-1 no hipocampo no tratamento crônico, fato que explica a diminuição do transporte de glutamato nesta estrutura. A hiperestimulação glutamatérgica, neste caso, relacionada à diminuição do transporte astrocitário, pode causar morte celular, alterações comportamentais e cognitivas (Bechtholt-Gompf et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos no teste de MTT, não foi observada diferença estatística significativa, o que demonstra que o tratamento com DN não altera a viabilidade mitocondrial em córtex e hipocampo e possivelmente não causou morte de células neurais. Entretanto, faz-se necessária uma investigação mais detalhada no que se refere à morte/viabilidade celular, diante desse tratamento. Apesar de não ser possível afirmar que o acúmulo de glutamato decorrente do tratamento com DN causou morte celular, a ruptura da homeostase glutamatérgica encontrada no presente trabalho, pode estar associado aos resultados comportamentais como o aumento da agressividade e diminuição de memória.

Estudos demonstram que o aumento da concentração de glutamato no córtex está diretamente relacionado ao aumento da agressividade, enquanto o mesmo aumento no hipocampo está relacionado a distúrbios cognitivos, como por exemplo, alterações na memória espacial. (Bechtholt-Gompf et al., 2010; Ghanizadeh & Namazi, 2010). Assim, é possível fazer uma associação entre a diminuição da captação de glutamato em fatias de córtex com o aumento significativo da agressividade dos animais diante do tratamento com DN. Também é coerente relacionar a diminuição da captação em hipocampo e a diminuição do imunoconteúdo dos transportadores GLT-1 com o prejuízo na memória espacial e na memória aversiva de curta duração observadas no presente trabalho, nos animais tratados com DN. No entanto, outras abordagens experimentais são necessárias para estabelecer a direta relação entre estas variáveis comportamentais e neuroquímicas.

4.3 Parâmetros Metabólicos

Avaliamos o efeito do tratamento crônico com DN sobre parâmetros bioquímicos sistêmicos como possíveis indicadores dos efeitos adversos do tratamento. O DN reduziu os níveis de colesterol total, HDL, e triglicérides corroborando com estudos realizados tanto em modelos animais como em humanos, que demonstram alteração do perfil lipídico (Glazer 1991; Palatini et al., 1996; Hartgens et al., 2004; Bonetti et al., 2008; Vieira et al., 2008). Os níveis de LDL colesterol não foram afetados pelo tratamento com DN. O perfil lipídico foi utilizado como um possível indicador de risco para doenças cardiovasculares associado ao tratamento. Realmente, estudos clínicos demonstram que fisiculturistas que utilizaram EAA tendem apresentar alterações significantes nos níveis de lipídios e maior risco para acidentes vasculares.

Por outro lado avaliamos os níveis de albumina e de ALT/TGP e AST/TGO como indicadores de lesão e atividade metabólica hepática. Os resultados sugerem que o tratamento

por 20 dias não afetou a função hepática o que corrobora com relatos prévios de Bonetti et al., 2008 em fisiculturistas do gênero masculino. Da mesma forma, funcionalidade renal não foi afetada com o tratamento. O estudo de Baume et al., 2006 demonstrou que tratamento com combinações dos EAA administrados via oral em atletas de *endurance* não alterou níveis sistêmicos de uréia. Sendo uréia é um produto final da degradação de aminoácidos, a dosagem dos seus níveis no sangue reflete a e função renal. A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina (creatina fosforilada) no músculo para obtenção de energia. Ela é geralmente produzida em uma taxa praticamente constante pelo corpo - taxa diretamente proporcional à massa muscular da pessoa: quanto maior a massa muscular, maior a taxa. Através da medida da creatinina do sangue, é possível calcular a taxa de filtração glomerular, que é um parâmetro utilizado em exames médicos para avaliar a função renal.

O peso corporal (massa magra) dos animais dos grupos CO e DN não apresentou diferenças estatísticas, corroborando com os estudo de Magnusson et al., 2009. O que pode ser explicado devido aos animais tratados com DN não realizarem exercício físico e também não estarem sendo tratados com uma dieta hiperprotéica. A combinação dieta e exercício físico são necessários para aumentar o peso corporal em roedores (Goodman & Gilman tradução da 9ª edição)

Em relação ao teste de tolerância a glicose (TTG) não houve diferença do grupo DN comparado ao grupo CO demonstrando que, tanto a secreção pancreática e sinalização da insulina, não sofreram alterações devido ao tratamento crônico. Isso também sugere que o metabolismo da glicose não foi afetado e que a disponibilidade desse substrato energético não estaria influenciando parâmetros comportamentais como agressividade e memória, ou parâmetros funcionais associados ao processo de neurotransmissão.

Os resultados da mensuração do peso dos testículos revelaram que o tratamento com DN produziu redução do peso testicular em relação ao peso corporal, demonstrado uma

atrofia testicular nos animais, fato que corrobora com diversos estudos em humanos, nos quais altas doses de EAA promovem esse efeito deletério sobre os órgãos sexuais em indivíduos do gênero masculino, causando impotência sexual (Ramo 1987; Torres-Calleja et al., 2001; Hartgens & Kuipers; 2004; Goodman & Gilman tradução da 9ª edição). Isto demonstra que mesmo por um período curto de tratamento, o DN causou modificações sistêmicas no perfil lipídico, sem alterações nos marcadores funcionais hepático e renal, mas alterou a morfologia dos órgãos reprodutores.

5. CONCLUSÕES

A administração crônica com DN prejudicou o comportamento exploratório no centro do campo aberto por mecanismos independentes da ansiedade.

O DN aumentou a agressividade e impulsividade em camundongos CF1, de forma tempo-dependente. Os animais do grupo DN tiveram uma redução no tempo de latência do primeiro ataque a partir do 16º dia de tratamento que se manteve até o 18º dia. Além disso, houve um aumento significativo do número de ataques.

A administração crônica com DN afetou a memória aversiva de curta duração (90 minutos após o teste).

As alterações comportamentais mais proeminentes associadas ao tratamento com DN como aumento agressividade e prejuízo na memória de curta duração não foram conseqüências de alterações funcionais e metabólicas sistêmicas. Nesse sentido, a disponibilidade de glicose como substrato energético não foi afetada nem o peso corporal dos animais. Entretanto, observou-se atrofia testicular, justificada pelo tratamento com DN em doses suprafisiológicas. Além disso, a administração crônica do DN acarretou em alteração do perfil lipídico séricos dos animais.

O desequilíbrio da função glutamatérgica evidenciado pela diminuição da captação de glutamato no córtex e hipocampo e do transportador GLT-1 pode ser um dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nas alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com o DN.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos dados do presente estudo, tem-se como perspectiva investigar:

- o imunoconteúdo: das proteínas apoptóticas BAD, PARP e caspase 3; de proteínas serina treonina cinase que estão relacionadas à memória e aprendizado ou morte celular no hipocampo e no córtex; das subunidades regulatórias do canal NMDA; dos transportadores GLT1 e GLAST em hipocampo e córtex.
- Realizar técnicas de imunohistoquímica para neurônios (NeuN), astrócitos (GFAP) e micróglia (IBA) do hipocampo e do córtex.
- Avaliar as possíveis correlações entre o imunoconteúdo das proteínas analisadas no córtex e hipocampo e os parâmetros comportamentais, bioquímicos e histológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson CM, Swanson RA. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**. 32(1): 1–14
- Bagatell CJ, Bremner WJ. (1996) Androgens in men-uses and abuses. **N Eng J Med**. 334(11): 707–714
- Bahrke MS, Yesalis CE. (2004) Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Curr Opin Pharmacol**. 4(6): 614–620
- Barfield RJ, Busch DE, Wallen K. (1972) Gonadal influence on agonistic behavior in the male domestic rat. **Horm Behav**. 3(3): 247–259
- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS (2001) Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**. 86(11): 5108–5117
- Baume N, Schumacher YO, Sottas PE, Bagutti C, Cauderay M, Mangin P, Saugy M. (2006) Effect of multiple oral doses of androgenic anabolic steroids on endurance performance and serum indices of physical stress in healthy male subjects. **Eur J Appl Physiol**. 98(4): 329–40
- Bechtholt-Gompf AJ, Walther HV, Adams MA, Carlezon WA Jr, Ongür D, Cohen BM. (2010) Blockade of Astrocytic Glutamate Uptake in Rats Induces Signs of Anhedonia and Impaired Spatial Memory. **Neuropsychopharmacology**. 35(10): 2049–2059
- Bing O, Heilig M, Kakoulidis P, Sundblad C, Wiklund L, Eriksson E. (1998) High doses of testosterone increase anticonflict behavior in rat. **Eur Neuropsychopharmacol**. 8(4): 321–3
- Bitran D, Kellogg CK, Hilvers RJ. (1993) Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABA_A receptors in the rat. **Horm Behav**. 27(4): 568–83
- Bolding G, Sherr L, Elford J. (2002) Use of anabolic steroids and associated health risks among gay men attending London gyms. **Addiction**. 97: 195–201
- Bonetti A, Tirelli F, Catapano A, Dazzi D, Dei Cas A, Solito F, Ceda G, Reverberi C, Monica C, Pipitone S, Elia G, Spattini M, Magnati G. (2008) Side Effects of Anabolic Androgenic Steroids Abuse. **Int J Sports Med**. 29(8): 679–687
- Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. (2001) Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. **Horm Behav**. 40(3): 409–18
- Bronson FH. (1996) Effects of prolonged exposure to anabolic steroids on the behavior of male and female mice. **Pharmacol Biochem Behav**. 53(2): 329–34
- Brooks RV, Firth R, Summer NA. (1975) Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. **Br J Sports Med**. 9(2): 89–92
- Brooks, JH, Reddon JR. (1996) Serum testosterone in violent and nonviolent young offenders. **J Clin Psychol**. 52(4): 475–483
- Buchner J. (1999) Hsp90 & Co.- a holding for folding. **Trends Biochem Sci**. 24(4): 136–41
- Camino-Torres R, Ma L, Snyder PJ. (1977). Testosterone-induced inhibition of the LH and FSH responses to gonadotropin-releasing hormone occurs slowly. **J Clin Endocrinol Metab**. 44(6): 1142–53

- Cato AC, Nestl A, Mink S. (2002) Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular Signaling Pathways. **SCI. STKE**. 138(9): 1–11
- Christie MH, Barfield RJ. (1979) Effects of castration and home cage residency on aggressive behavior in rats. **Horm Behav**. 13(1): 85–91
- Clark AS, Mitre MC, Brinck-Johnsen T. (1995) Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. **Brain Res**. 679(1): 64–71
- Clark AS, Barber DM. (1994) Anabolic-androgenic steroids and aggression in castrated male rats. **Physiol Behav**. 56(5): 1107–13
- Clark AS, Harrold EV, Fast AS. (1997) Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Horm Behav**. 31(1): 35–46
- Clark AS, Harrold EV. (1997) Comparison of the effects of stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate on the sexual behavior of castrated male rats. **Behav Neurosci**. 111(6): 1368–74
- Clark AS, Henderson LP. (2003) Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neurosci Biobehav Rev**. 27(5): 413–436
- Cooper CJ, Noakes TD, Dunne T, Lambert MI, Rochford K. (1996) A high prevalence of abnormal personality traits in chronic users of anabolic-androgenic steroids. **Br J Sports Med**. 30(3): 246–250
- Creutzberg EC, Schols AM. (1999) Anabolic steroids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2(3): 243–53
- Cunha TS, Cunha NS, Moura MJCS, Marcondes FK. (2004) Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Rev Bras Ciênc Farmac**. 40(2): 165–79
- Cunningham GR, Silverman VE, Thornby J, Kohler PO. (1979) The potential for an androgen male contraceptive. **J Clin Endocrinol Metab**. 49(4): 520–6
- Danbolt NC. (2001) Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**. 65(1): 1–105
- Demling RH, DeSanti L. (1998) Closure of the “non-healing wound” corresponds with correlation of weight loss using the anabolic agent oxandrolone. **Ostomy Wound Manage**. 44(10): 58–62
- Demling RH, DeSanti L. (1997) Oxandrolone, an anabolic steroid, significantly increases the rate of weight gain in the recovery phase after major burns. **J Trauma**. 43(1): 47–51
- Demling RH, DeSanti L. (2001) The rate of restoration of body weight after burn injury, using the anabolic agent oxandrolone, is not age dependent. **Burns**. 27(1): 46–51
- Evans NA. (1997) Gym and tonic: a profile of 100 male steroid users. **Br J Sports Med**. 31(1): 54–58
- Evans NA. (2004) Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. **Am J Sports Med**. 32(2): 534–542
- Evans-Brown MJ, Mcveigh J. (2008). An introduction to anabolic steroids. **SportEX medicine**. 38:20–26
- Falangia V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, Yamaguchi Y. (1998) Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. **J Invest Dermatol**. 111(6): 1193–1197

- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. (2000) Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev.** 52(4): 513–556
- Farrell SF, McGinnis MY. (2003) Effects of pubertal anabolic-androgenic steroid (AAS) administration on reproductive and aggressive behaviors in male rats. **Behav Neurosci.** 117(5): 904–911
- Friedewald WT, Levy RI e Fredrickson DS. (1972) Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clin Chem.** 18(6): 499–502
- Gaughan WJ, Liss KA, Dunn SR, Mangold AM, Buhsmer JP, Michael B, Burke JF. (1997) A6-month study of low-dose recombinant human erythropoietin alone and in combination with androgens for the treatment of anemia in chronic hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis.** 30(4): 495–500
- Gelfand JA, Sherins RJ, Alling DW, Frank MM. (1976) Treatment of hereditary angioedema with danazol. **N Engl J Med.** 295(26): 1444–48
- Ghanizadeh A, Namazi MR. (2010) A possible research and clinical implication of association of homocysteine and glutamate levels in brain for management of aggression. **Int J Dev Neurosci.** 28(2): 125
- Glazer G. (1991) Atherogenic effect of anabolic steroids on serum lipid levels. A literature review. **Arch Intern Med.** 151(10): 1925–1933
- Goodman & Gilman's. - The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (editores). New York: **McGraw-Hill**, 2006.
- Grivetti LE, Applegate EA. (1997) From Olympia to Atlanta: a cultural-historical perspective on diet and athletic training. **J Nutr.** 127(5): 860–868
- Hall RC, Hall RC, Chapman MJ. (2005) Psychiatric complications of anabolic steroid abuse. **Psychosomatics.** 46(4): 285–290
- Handa RJ, Reid DL, Resko JA. (1986) Androgen receptors in brain and pituitary of female rats: cyclic changes and comparisons with the male. **Biol Reprod.** 34(2): 293–303
- Handelsman DJ, Heather A. (2008) Androgen abuse in sports. **Asian J Androl** 10(3): 403–415
- Hartgens F, Kuipers H. (2004) Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. **Sports Med** 34(8): 513–554
- Hartgens F, Rietjens G, Keizer HA, Kuipers H, Wolffenbuttel BH. (2004) Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). **Br J Sports Med.** 38(3): 253–9
- Heindel JJ, Berkowitz AS, Kyle G, Luthra R, Bruckner JV. (1989) Assessment in rats of the gonadotoxic and hepatorenal toxic potential of dibromochloropropane (DBCP) in drinking water. **Fundam Appl Toxicol.** 13(4): 804–15
- Hough DO. (1990) Anabolic steroids and ergogenic aids. **Am. Fam. Phys.** 41(4): 1157–1164
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Da Silva WC, Medina JH, Cammarota M. (2006) The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. **Neurotox Res** 10(2): 113–21

- Kazlauckas V, Kalinine E, Leke R, Oses JP, Nunes F, Espinosa J, Mioranza S, Lulhier F, Portela LV, Porciúncula LO, Lara DR. (2011) Distinctive effects of unpredictable subchronic stress on memory, serum corticosterone and hippocampal BDNF levels in high and low exploratory mice. **Behav Brain Res.** 218(1): 80–86
- Kazlauckas V, Schuh J, Dall'Igna OP, Pereira GS, Bonan CD, Lara DR. (2005) Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. **Behav Brain Res.** 162(2): 272–278
- Kennedy BJ. (1974) Hormonal therapies in breast cancer. **Semin Oncol.** 1(2): 119–30
- Kicman AT. (2008) Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol.** 154(3): 502–521
- Kochakian CD. (1993). History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. **Wien Med Wochenschr.** 143(14-15): 359–63
- Kopera H. (1985) The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. **Acta Endocrinol Suppl (Copenh).** 271: 11–8
- Kouvelas D, Pourzitaki C, Papazisis G, Dagklis T, Dimou K, Kraus MM. (2008) Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. **Int J Neuropsychopharmacol.** 11(7): 925–934
- Le Grevès P, Huang W, Johansson P, Thörnwall M, Zhou Q, Nyberg F. (1997) Effects of an anabolic-androgenic steroid on the regulation of the NMDA: receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in brain regions of the male rat. **Neurosci Lett.** 226 (1): 61–64
- Lindqvist AS, Johansson-Steensland P, Nyberg F, Fahlke C. (2002) Anabolic androgenic steroid affects competitive behaviour, behavioural response to ethanol and brain serotonin levels. **Behav Brain Res.** 133(1): 21–9
- Lukas SE. (1996) CNS effects and abuse liability of anabolic-androgenic steroids. **Ann Rev Pharmacol Toxicol.** 36: 333–57
- Lumia AR, Thorner KM, McGinnis MY. (1994) Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. **Physiol Behav.** 55(2): 331–5
- Magnusson K, Hånell A, Bazov I, Clausen F, Zhou Q, Nyberg F. (2009) Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats. **Neurosci Lett.** 467(3): 189–193
- Malgar LA, Fisher JW. (1970). Effects of testosterone on erythropoietin production in isolated perfused kidney. **Am J Physiol.** 218(6): 1732–36
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes A constant threat. **Toxicol Lett.** 158(3): 167–175
- Martínez-Sanchis S, Aragon CM, Salvador A. (2002) Cocaine-induced locomotor activity is enhanced by exogenous testosterone. **Physiol Behav.** 76(4-5):605–9
- Martínez-Sanchis S, Brain PF, Salvador A, Simón VM. (1996) Long-term Chronic treatment with stanozolol lacks significant effects on Aggression and activity in young and adult male laboratory mice. **Gen Pharmacol.** 27 (2): 293–8
- Martini L. (1982) The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. **Endocr Rev.** 3(1):1–25

- McGinnis MY, Lumia AR, Breuer ME, Possidente B. (2002) Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids. **Horm Behav** 41: 101–10.
- McGinnis MY. (2004) Anabolic Androgenic Steroids and Aggression Studies Using Animal Models. **Ann N Y Acad Sci.** 1036: 399–415
- Menard CS, Harlan RE. (1993) Up-regulation of androgen receptor immunoreactivity in the rat brain by androgenic-anabolic steroids. **Brain Res** 622(1-2):226–36
- Minkin DM, Meyer ME, Van Haaren F. (1993) Behavioral effects of long term administration of anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav** 44(4):959–63
- Müller AP Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV. (2010) Exercise Increases Insulin Signaling in the Hippocampus: Physiological Effects and Pharmacological Impact of Intracerebroventricular Insulin Administration in Mice. **Hippocampus** doi: 10.1002/hipo.20822.
- Oliveira IJ, Molz S, Souza DO, Tasca CI. (2002) Neuroprotective effects of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. **Cell Mol Neurobiol.** 22(3):335-44
- Palatini P, Giada F, Garavelli G, Sinisi F, Mario L, Michieletto M, Baldo-Enzi G. (1996) Cardiovascular effects of anabolic steroids in weight-trained subjects. **J Clin Pharmacol.** 36(12):1132–40
- Pardridge WM. (1986). Serum bioavailability of sex steroid hormones. **Clin Endocrinol Metab.** 15(2):259–78
- Parrott AC, Choi PY, Davies M. (1994) Anabolic steroid use by amateur athletes: effects upon psychological mood states. **J Sports Med Physical Fitness.** 34(3): 292–8
- Peterson GL. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.** 83(2):346–56
- Petersson A, Garle M, Holmgren P, Druid H, Krantz P, Thiblin I. (2006) Toxicological findings and manner of death in autopsied users of anabolic androgenic steroids. **Drug Alcohol Depend.** 81(3): 241–9
- Pratt WB, Toft DO. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocr Rev.** 18(3): 306–360
- Rämö P, Kettunen R, Timisjärvi J, Takala T, Hirvonen L. (1987) Anabolic steroids alter the haemodynamic effects of endurance training on the canine left ventricle. **Pflugers Arch** 410(3): 272–8
- Ramos A. (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci.** 29(10):493–498
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Gardner, P. - Pharmacology - 6^a. ed., Elsevier, New York, 2008.
- Rockhold RW. (1993) Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 33: 497–520
- Ryan KJ. (1959) Biological aromatization of steroids. **J Biol Chem** 234(2): 268–72

- Salas-Ramireza KY, Montalto PR, Siska CL. (2010) Anabolic steroids have long-lasting effects on male social behaviors. **Behav Brain Res** 208(2): 328–335
- Schänzer W. (1996) Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clin Chem.** 42(7): 1001–20
- Shahidi NT. (2001) A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. **Clin Ther.** 23(9): 1355–1390
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson, LW. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study, **J Comp Neurol** 294: 76–95
- Sjöqvist F, Garle M, Rane A. (2008) Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **Lancet** 371(9627): 1872–82
- Smith ST, Stackman RW, Clark AS. (1996) Spatial working memory is preserved in rats treated with anabolic-androgenic steroids. **Brain Res** 737(1-2): 313–6
- Snyder PJ. (1984) Clinical Use of Androgens. **Ann Rev Med** 35: 207–17
- Su TP, Pagliaro M, Schmidt PJ, Pickar D, Wolkowitz O, Rubinow DR. (1993) Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. **JAMA** 269(2): 2760–4.
- Svare BB. (1990) Anabolic steroids and behavior: a preclinical research perspective. **NIDA Res Monographs** 102: 224–41
- Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST. (2004) Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. **Mech Ageing Dev.** 125 (7): 475–481
- Torres-Calleja J, González-Unzaga M, DeCelis-Carrillo R, Calzada-Sánchez L, Pedrón N. (2001) Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. **Life Sci** 68(15):1769–74
- Uzych L. (1992) Anabolic-androgenic steroids and psychiatric-related effects: A review. **Can J Psychiatry** 37(1): 23–8
- Vieira RP, França RF, Damaceno-Rodrigues NR, Dolhnikoff M, Caldini EG, Carvalho CR, Ribeiro W. (2008) Dose-Dependent Hepatic Response to Subchronic Administration of Nandrolone Decanoate. **Med Sci Sports Exerc** 40(5): 842–847
- Wang C, Alexander G, Berman N, Salehian B, Davidson T, McDonald V, Steiner B, Hull L, Callegari C, Swerdloff RS. (1996) Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men—a clinical research center study. **J Clin Endocrinol Metab** 81(10): 3578–3583
- Wilson JD. (1988) Androgen abuse by athletes. **Endocrinol Rev** 9(2):181–99
- Winters SJ. (1990) Androgens: endocrine physiology and pharmacology. **NIDA Res Monogr** 102: 113–30