

**AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE EM RATOS JOVENS
TRATADOS COM OXANDROLONA EM DOSE
SEMELHANTE À TERAPÊUTICA E DOSE DE ABUSO**

NARA RUBIA DALLA BERNARDINA

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, Junho de 2019

NARA RUBIA DALLA BERNARDINA

**AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE EM RATOS JOVENS
TRATADOS COM OXANDROLONA EM DOSE
SEMELHANTE À TERAPÊUTICA E DOSE DE ABUSO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, em cumprimento às exigências parciais para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli

Vitória

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula: 2017132597

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Avaliação da ansiedade em ratos jovens tratados com oxandrolona em dose semelhante à terapêutica e dose de abuso", apresentada e defendida publicamente pela aluna Nara Rubia Dalla Bernardina, no dia 28 de junho de 2019, às 8h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 28 de junho de 2019.

Profª. Drª. Nazaré Souza Bissoli
Orientadora - UFES

Profª. Drª Livia Carla Rodrigues
UFES

Profª Drª Girlândia Alexandre Brasil
UVV

Prof. Dra. Sônia Gôuvea
Coordenadora do PPGCF – UFES

Vitória, Junho de 2019

Bernardina, Nara Rubia Dalla, 1993

Avaliação da ansiedade em ratos jovens tratados com oxandrolona em dose semelhante á terapêutica e dose de abuso [Vitória] 2019

xvi, 67 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2019).

Orientador: Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Oxandrolona;
2. Esteroides;
3. Ansiedade;
4. Dopamina;
5. Citocina Inflamatória;
6. Estresse Oxidativo

O problema do mundo é que tolos e
fanáticos estão sempre cheios de certezas
enquanto os sábios estão cheios de dúvidas
Bertrand Russel

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, que nunca mediram esforços pra me ver crescer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela minha vida e a vidas das pessoas a minha volta, pelas oportunidades e por me sustentar em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais **Sandro e Rosimara** por todo amor, paciência e as dificuldades que passaram para priorizarem a minha educação, o meu crescimento, meus estudos, pelo apoio a todo o momento, por me fazer ser quem eu sou hoje e poder dar orgulho a vocês. Eu amo vocês.

A minha irmã **Lara**, que é a coisa mais preciosa da minha vida e tudo que eu faço é para poder incentivar e tirar sempre o melhor do que está em seu coração.

A minha avó **Angelita**, que sempre torceu por mim, sempre pediu a Deus pra me iluminar, sempre conversou com meu anjo da guarda e cá estou, conquistando mais uma vitória que também é sua!

Ao meu noivo **Thiago**, que sempre foi suporte, motivação, força, descontração e amor. Obrigada por todas as palavras que eu precisei ouvir por estar sempre ao meu lado principalmente nos momentos de dúvida e de dificuldade. Obrigada por entender minha ausência, meu desespero e nunca deixar de me incentivar e me apoiar.

A minha Orientadora **Professora Nazaré Souza Bissoli**, por ter me aceitado, por acolher e cuidar como família, por orientar com tanto amor e dedicação, por ser a melhor orientadora que alguém poderia ter. Obrigada por tanta paciência, por respeitar o meu tempo, por tanto carinho e suporte e embarcar em uma aventura com uma área diferente do que habitualmente se trabalha no LHE.

A minha co-orientadora **Professora Lívia Carla**, por me auxiliar em todas as dúvidas e suporte durante todo o projeto, sempre cheia de alegria e alto astral, ensinando com muita paciência e auxiliando em todos os momentos. Obrigada por me emprestar seu laboratório e disponibilizando todos os recursos necessários pra realizar esse trabalho.

A **Girlândia** por ter elaborado o projeto durante o seu pós-doutorado e por toda ajuda e experiência durante esse tempo para que esses resultados e essa defesa se tornassem possíveis e relevantes.

A **Mariana Couto**, que foi minha porta de entrada para esse caminho, pro LHE e que na alegria ou na tristeza a gente conseguiu chegar até aqui. E junto com **Glauciene**, foram fundamentais em todas as etapas com risadas e desesperos, trabalharam muito para que esse trabalho chegasse até o final. Juntas vocês foram minhas doses de alegria quando tudo parecia dar errado. Obrigada por toda boa vontade em me ajudar.

A **Phablo**, que sem ele, eu não conseguia ver esse trabalho se concretizando. Por todos os plantões na UFES, orientação à distância e paciência. Obrigada por dar cara aos 2 anos de projeto e sempre acreditar que eu podia mais e posso ser melhor.

Ao **Silas Ronchi** e **Edgar Mendes** por terem participado desse projeto comigo, compartilhando as dificuldades e os ensinamentos, contribuindo com toda ajuda necessária, dividindo as tarefas e os resultados desse momento tão importante. Obrigada pelo companheirismo do dia a dia.

Aos colegas do LHE, Pollyana Peixoto, Antônio Melo, Polyana Dalpiaz, Marcos Birocale, Leonardo Escouto, Felipe, Mayara, Ana Carolina e Marília por estarem sempre disponíveis pra tirar uma dúvida, tratar os animais ou simplesmente pra conversar e descontrair. Obrigada a todos do LHE pelos incontáveis almoços e comemorações e me sentir em casa, com amor, comida e risadas. Simples almoços que se tornam momentos especiais e que ficarão sempre guardados com muito carinho.

Aos meus familiares e a minha segunda família, **Beltrane's e Coutinho's** por todos os momentos que passamos, por todas as ausências, por todo o apoio e por sempre acreditarem em mim, uma família que ganhei e que não me imagino sem. Sempre dispostos a ajudar, com muita alegria, com muitos domingos em família e cheios de amor. Obrigada por me receberem tão bem, amo todos vocês.

Aos meus amigos que estiveram do meu lado e que fazem parte dessa conquista, obrigada pelo companheirismo, pelos momentos únicos que vivemos e pela amizade que me ajudou a crescer, evoluir, me tornar quem eu sou. Vocês são únicos na minha vida e sem vocês, eu não seria a mesma coisa. A família que a gente não escolheu, mas o universo fez questão de juntar porque nossa amizade só nos edifica. Obrigada por tudo que a gente vive e nos fazer enxergar que estamos aqui unidos na vitória e nas dificuldades. Vocês são muito especiais. Amo demais.

Aos ratinhos, que deram suas vidas para a realização desse e de tantos projetos, contribuem para o desenvolvimento e compreensão da ciência. Eles merecem todo respeito, reconhecimento, e principalmente cuidados adequados durante todos os procedimentos, pois sem eles nada disso seria possível.

A UFES e ao PPGCF pela estrutura que permite a minha formação e a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro fornecido a essa e a tantas outras pesquisas em nossa instituição.

A todos que não listados aqui, mas que merecem meu muito obrigado por de alguma forma terem contribuído com esse trabalho e tornaram possível sua conclusão, nem que seja por um sorriso. Ninguém realiza nada sozinho, essa conquista é também de todas as pessoas que cruzaram meu caminho e me ajudaram a estar aqui.

Gratidão a Deus e as batalhas vencidas até aqui. **MUITO OBRIGADA!**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OXANDROLONA	20
1.2 EFEITOS COMPORTAMENTAIS	23
1.3 VIAS DOPAMINÉRGICAS	28
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E VIA INFLAMATÓRIA	30
2. OBJETIVO	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	34
3.2 DROGA	34
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
3.4 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA	36
3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO	37
3.6 ANÁLISE DE PROTEINAS POR WESTERN BLOT	38
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS	41
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação da ligação do esteroide nos receptores de androgênios localizados na membrana plasmática formando o complexo hormônio-receptor (AR) caracterizando os efeitos não genômicos dessa via. Ligação do andrógeno ao receptor citoplasmático após atravessar a membrana plasmática, formando AR e caracterizando a via genômica após migração do complexo hormônio-receptor até o núcleo da célula ativando a transcrição gênica e tradução do RNA mensageiro em proteína. Adaptado de Hammes, 2015..... **18**
- Figura 2:** Estrutura química dos exemplos representativos das três maiores classes de EAA **20**
- Figura 3:** Aparência de paciente com síndrome de Turner **22**
- Figura 4:** Representação de algumas regiões que fazem parte do sistema mesolímbico no cérebro humano, que atuam em conjunto para desenvolver as funções e atividades desse sistema..... **24**
- Figura 5:** A três maiores projeções dopaminérgicas no SNC. (1) Via nigroestriatal: a substância nigra projeta para o estriado dorsal; essa é a via que se degenera na doença de Parkinson. (2) A ATV projeta para o estriado ventral (núcleo accumbens), bulbo olfatório, amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, orbital e medial e giro cingulado. O termo “mesolímbico” ou “mesocortical” é usado frequentemente para descrever os componentes das projeções da ATV. (3) Projeções do Núcleo Arqueado do hipotálamo, de onde a dopamina é distribuída para a hipófise anterior, chamada de via tuberoinfundibular. Adaptado e modificado de Cooper, Bloom e Roth (2003)..... **25**
- Figura 6:** Esquema representativo das possíveis ações relacionadas ao uso abusivo de EAA no desenvolvimento da dependência **27**

Figura 7: Modulação alostérica da função do receptor de neurotransmissores pelo EAA. Representação esquemática do receptor GABA _A . O receptor GABA _A é uma proteína pentamérica com uma estequiometria proposta de 2 α , 2 β e uma subunidade γ	29
Figura 8: Representação da influência do uso de EAA promovendo desequilíbrio oxidativo pelo aumento de substâncias pró-oxidantes induzindo o aumento de citocinas inflamatórias, gerando inflamação.....	32
Figura 9: Resumo do protocolo experimental.....	35
Figura 10: Imagem representativa de um LCE composto por dois braços fechados e por dois braços abertos onde o rato tem seu teste gravado por 5 minutos para análise posterior	36
Figura 11: Imagem demonstrativa do teste de Campo Aberto a partir de um programa AnyMaze utilizado para análise das gravações do teste. As áreas em verde delimitam a região central do CA ou a periferia, regiões que são consideradas para a análise do comportamento dos ratos	37
Figura 12: Esquema global de uma eletroforese em gel	39
Figura 13: Efeito dos tratamentos no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos ou fechados do LCE	41
Figura 14: Efeito dos tratamentos na atividade locomotora no teste de CA.....	43
Figura 15: Efeito dos tratamentos na expressão do DrD2.....	44
Figura 16: Efeito dos tratamentos na expressão das proteínas SOD e CAT.....	45

Figura 17: Efeito dos tratamentos na expressão da proteína TNF-a no hipocampo, amígdala e córtex.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AR	Receptor de Andrógeno
ARKO	Knockout Receptor de Andrógenos
ATV	Área Tegmental Ventral
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA	Campo Aberto
CAT	Catalase
CMC	Carboximetilcelulose
COMT	Catecol O-Metiltransferase
CPF	Córtex Pré Frontal
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
Deca	Decanoato de Nandrolona
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DrD1	Receptor de Dopamina do tipo 1
DrD2	Receptor de Dopamina do tipo 2
EAA	Esteroides Anabólicos Androgênicos
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
GABA	Ácido aminobutírico
GPx	Glutathione Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAO	Monoamina Oxidase
MC4R	Receptor de melanocortina tipo 4
MDA	Malondialdeído
NF-κB	Factor Nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
O ₂	Oxigênio

O_2^-	Ânion Superóxido
ONOO-	Peróxido Nitrito
OXA	Oxandrolona
PREG	Pregnenolona
PREGS	Sulfato de Pregnenolona
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
ST	Síndrome de Turner
T	Testosterona
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WADA	Agência Mundial Antidoping

RESUMO

A oxandrolona (OXA) é um esteroide anabólico androgênico (EAA) utilizado na prática clínica para tratamento de distúrbios de crescimento em crianças (ou durante a infância) e vem sendo consumido de forma abusiva. Mediante o pouco conhecimento que se tem dos efeitos comportamentais da OXA em especial em jovens e em uso abusivo, nossa hipótese é que seu uso em dose acima da terapêutica pode alterar o comportamento ansioso em ratos jovens, mas que não apresente alteração em dose semelhante à terapêutica, envolvendo mecanismos antioxidantes, inflamação e alterações nas vias dopaminérgicas. Para isso ratos Wistar machos com idade de 30 dias foram tratados com oxandrolona (DT; 2,5mg/kg/dia e DA: 37,5mg/kg/dia) ou veículo (CON; carboximetilcelulose 0.5% 0,1ml/dia) via gavagem por 4 semanas. Após o período de tratamento os animais foram submetidos a testes comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto, além de testes bioquímicos. Ambos os grupos apresentaram comportamento ansioso surpreendentemente havendo mais alterações na dose semelhante à terapêutica do que na dose de abuso. As alterações relacionadas ao sistema antioxidante foram observadas apenas no hipocampo e diferiram com as dose de tratamento sendo alterada apenas no grupo DT. A expressão do receptor de dopamina apresentou tendência em aumentar na dose abusiva. O presente estudo demonstrou que a oxandrolona promove comportamento semelhante ao ansioso em ratos, tanto na dose semelhante à terapêutica quanto na dose de abuso, envolvendo alteração na via antioxidante e com tendência de aumento do receptor de dopamina no hipocampo.

Palavras – chave: Oxandrolona, esteroides, ansiedade, estresse oxidativo, citocina inflamatória

ABSTRACT

Oxandrolone (OXA) is an androgenic anabolic steroid (AAS) used in clinical practice for the treatment of growth disorders in children (or during childhood) and has been used in the form of abuse. Due to the lack of knowledge about the behavioral effects of OXA, particularly in young and abusive use, our hypothesis is that its use in an abusive dose can alter anxious behavior in young rats, but does not show a change in dose similar to therapeutic, involving antioxidant mechanisms, inflammation and alterations in the dopaminergic pathways. For that, male wistar rats aged 30 days were treated with oxandrolone (TD, 2.5mg / kg / day and AD: 37.5mg / kg / day) or vehicle (CON, carboxymethylcellulose 0.5% 0.1ml / day) via gavage for 4 weeks. After the treatment period the animals were submitted to behavioral tests of Elevate Plus Maze and Open Field and biochemical tests. Both groups showed anxious behavior, but surprisingly with more changes in the therapeutic dose than abusive dose. Alterations related to the antioxidative system were observed only in the hippocampus and differed with the treatment dose being altered only in the TD group. The expression of the dopamine receptor showed a tendency to increase in the abusive dose. The present study demonstrated that oxandrolone promotes anxiety-like behavior in rats, both at the therapeutic and abusive doses, involving changes in the antioxidant pathway and with a tendency to increase the dopamine receptor in the hippocampus.

Key words: Oxandrolone, steroids, anxiety, oxidative stress, inflammatory cytokines

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios esteroides são moléculas endógenas, sintetizados a partir do colesterol, incluindo os corticoides, os metabólitos ativos da vitamina D e aqueles produzidos pelas gônadas masculinas (testosterona) e femininas (estrogênio e progesterona). Referente a isso, foram desenvolvidas moléculas sintéticas a partir da testosterona (T), denominadas de Esteroides Anabolizantes ou Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA), com estrutura e características semelhantes ao hormônio endógeno (Cunha et al., 2004), visando ser utilizada como medicação para condições diversas.

Esses EAAs começaram a ser desenvolvidos em meados de 1940 a partir da capacidade de desenvolvimento de síntese laboratorial da testosterona por Leopold Ruzicka e Butenandt (Butenandt; Hanisch 1935; Ruzicka; Wettstein 1935), e posteriormente sendo possível realizar modificações em sua estrutura com o intuito de mimetizar ou potencializar algumas respostas fisiológicas da molécula de origem.

As ações dos EAAs podem ser divididas em duas categorias principais: efeitos androgênicos, relacionados especificamente com a função reprodutora e características sexuais secundárias, e efeitos anabólicos que de maneira geral dizem respeito à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não reprodutores (Mooradian et al., 1987; Hartgens; Kuipers, 2004). Em geral, os EAAs possuem mais efeitos anabólicos e menos androgênicos, sendo até hoje impossível uma molécula puramente anabólica (Basaria; Wahlstrom; Dobs, 2001).

Dessa forma, as indústrias farmacêuticas veem produzindo EAAs com fins terapêuticos sendo utilizados para tratar doenças relacionadas a disfunções hormonais como hipogonadismo, na recuperação de cirurgias de grande porte onde há perda de massa muscular e atrofia musculares. Devido às características anabólicas, por melhorarem o balanço nitrogenado em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra e reduzindo o aumento de tecido adiposo, e, também, no tratamento da osteoporose e anemias, uma vez que estimulam a

eritropoiese, podendo ser indicado para tratamento de homens e mulheres nessas condições (Celotti, Cesi, 1992; Creutzberg et al., 2003; Hebert et al., 1984), além de incluir o tratamento de baixa estatura (tal como Síndrome de Turner) e angiodema hereditário (Basaria; Wahlstrom; Dobs, 2001).

Os mecanismos específicos pelos quais os EAAs atuam para exercerem seus efeitos ainda não são totalmente elucidados. A via de ação não-genômica se dá pela ligação hormônio-receptor na membrana plasmática, não influenciando a expressão direta de genes, entretanto impulsiona efeitos mais rápidos, tais como a ativação de cascata de sinalização. Os hormônios esteroidais ao se ligarem a receptores acoplados às proteínas G induzem uma resposta mediada por canais iônicos (ex. aumentando o cálcio intracelular) e/ou segundos mensageiros (Shirpoor, 2019), como mostrado na figura 1.

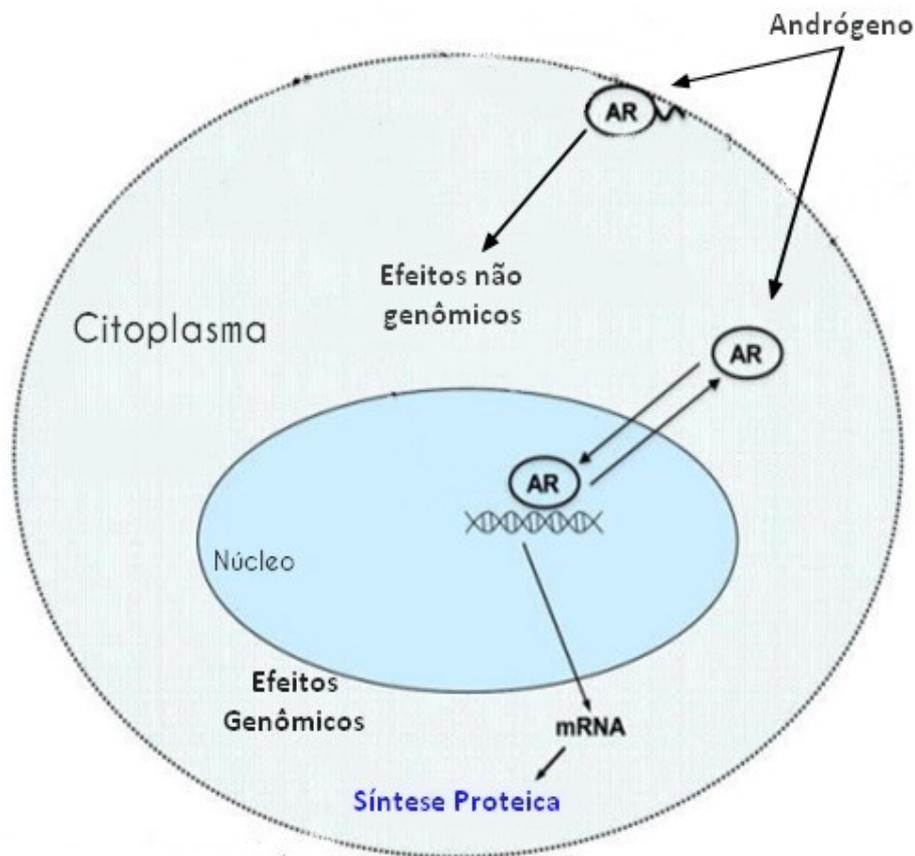


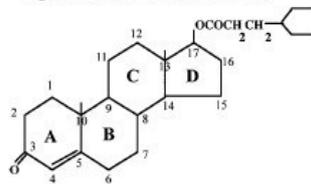
Figura 1: Representação da ligação do esteroide nos receptores de androgênios localizados na membrana plasmática formando o complexo hormônio-receptor (AR) caracterizando os efeitos não genômicos dessa via. Ligação do andrógeno ao receptor citoplasmático após atravessar a membrana plasmática, formando AR e caracterizando a via genômica após migração do complexo hormônio-receptor até o núcleo da célula ativando a transcrição gênica e tradução do RNA mensageiro em proteína. Modificado de Hammes, 2015.

Os EAAs circulam livremente na corrente sanguínea ou conjugados às proteínas plasmáticas, como a albumina, porém, somente o EAAs em estado livre é capaz de atravessar a membrana plasmática da célula e compor o complexo hormônio-receptor que possui alta afinidade pelo núcleo celular, onde se ligará com avidéz a sítios específicos da cromatina nuclear ativando a RNA polimerase e iniciando o processo de transcrição gênica, representando seus efeitos genômicos.

As principais classes de EAA que foram desenvolvidas são os ésteres de testosterona, com os C19 substituídos e os C17 alquilados, como demonstrados na figura 2 (Clark e Henderson, 2003). Os esteroides 17α -alquilados possuem um radical alquila na posição 17 que confere o diferencial de serem absorvidos oralmente com uma significativa redução do estresse hepático (Shahidi, 2001), relacionado à metabolização de primeira passagem.

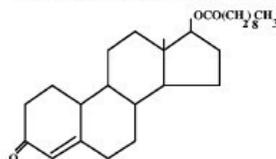
I. Ésteres de Testosterona

Cipionato de Testosterona



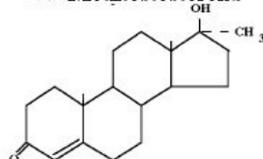
II. 19-nortestosterona

Decanoato de Nandrolona

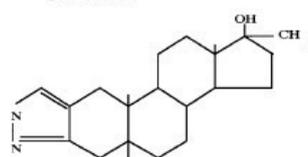


III. 17 α -alquilados

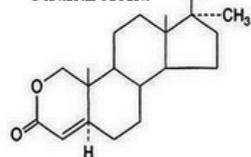
17 α -Metilttestosterona



Stanozolol



Oxandrolona



Oximetolona

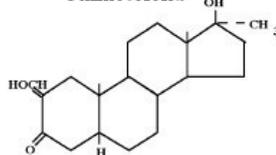


Figura 2: Estrutura química dos exemplos representativos das três maiores classes de EAA. Adaptado e modificado de Clark e Henderson, 2003.

1.1 OXANDROLONA

Dentre esses fármacos, um dos menos estudados é a oxandrolona (OXA), apesar de ser bastante utilizada na clínica. A OXA (17 α -Hydroxy-17-methyl-2-oxa-5-androstan-3-ona) pertence à classe dos 17 α -alquilados e possui uma baixa taxa de biotransformação hepática, sendo seu principal metabólito a 17-epioxandrolona. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 95% e cerca de 30% da OXA é excretada de forma inalterada na urina (Akyurek e Dunn, 2006), possuindo tempo de meia vida de 5 a 13 horas (Karim et al. 1973). Diferentemente da testosterona e a maioria das classes de EAAs, a oxandrolona não sofre ação da 5 α -

reductase, que transforma testosterona em diidrotestosterona, assim como também não sofre a ação da enzima aromatase que converte testosterona em estrógenos (Campos, 2004; Winters, 1990).

Clinicamente a OXA é indicada no tratamento de doenças que conferem perda de massa muscular, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Kicman, 2008), perda de peso após cirurgias, desordens neuromusculares, hepatite alcoólica e para fins estéticos como auxílio para a redução de gordura corporal e aumento de massa muscular (Hebert et al, 1984; Celotti, Cesi, 1992; Creutzberg et al., 2003; Kicman, 2008; Davis, 2018; FDA, 2016). A oxandrolona também vem sendo bem utilizada no tratamento de perda abrupta de massa muscular causada por queimaduras. Um estudo multicêntrico prospectivo, randomizado e duplo cego concluiu que o uso de oxandrolona em pacientes adultos diminuiu o tempo de internação em 3 dias e ainda observou-se outros benefícios relacionados à recuperação, como tempo de cicatrização reduzido em 4,4 dias, redução da perda de peso em 5kg, ganho de massa magra após a lesão de 3,99% e 10,78% em 6 e 12 meses respectivamente (Reeves et. al., 2016; Tuvdendorj et. al., 2011).

Curiosamente, em pacientes pediátricos, a oxandrolona associada ao β -bloqueador propranolol foi capaz de atenuar a interrupção do crescimento induzida por queimadura, encurtando a duração do tratamento em 84 dias e aumentando a taxa de crescimento em 1,7 cm por ano (Chao et al., 2018). Além disso, o uso de oxandrolona por até 2 anos está associado a melhora no conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e velocidade de crescimento em pacientes pós queimaduras (Przkora, Herndon, Suman, 2007). Além disso, por ter efeitos androgênicos pequenos, a oxa pode ser administrada em pacientes infantes (maiores de 9 anos) que apresentem problemas no crescimento, como baixa estatura idiopática, atraso na puberdade ou devido a doenças raras, como a Síndrome de Turner (ST) (figura 3), que é uma doença genética associada à falta parcial ou total do cromossomo X, acometendo apenas o sexo feminino (Abramowitz, Stichelen e Hanover, 2014; Ross et al., 2009), tendo o hipogonadismo como uma das principais características e por isso, tem a reposição hormonal indicada para o desenvolvimento dos caracteres sexuais femininos (Menke et al., 2010). Descrita primeiramente por um anatomista italiano Giovanni Morgagni em 1768 (Jung et al., 2009), e anos depois, em 1938, foi detalhada por Turner (Turner,

1938). Segundo ensaio holandês, randomizado, placebo-controle, duplo-cego, dose-resposta relatado por Menke et al em 2010, a dose recomendada dessa droga é de 0,03mg/kg/dia podendo alcançar 0,06mg/kg/dia, enquanto para as outras doenças, existe indicação de dose de 2,5-5mg/dia oralmente por um período menor que 1 ano (Ranke, 2013).



Figura 3: Aparência de paciente com síndrome de Turner. Fonte: Bucerzan et. al., 2017.

A eficácia e a segurança da oxandrolona foram analisadas por Fenichel et al. (2001) em ensaio randomizado em meninos com Distrofia Muscular de Duchenne, que é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X que promove perda progressiva de força e massa muscular, descrito em meados dos anos 1800 por Meryon, 1852 e Duchenne, 1868 (Hoffman, Brown & Kunkel, 1987) e não observou-se efeitos adversos atribuídos a oxandrolona, concluindo ser essa substância segura para tratamentos de crianças. Akyurek e Dunn (2006) realizaram uma revisão e

concluíram que apesar do tratamento ter alguns poucos efeitos, estes eram reversíveis, portanto, seguro e eficaz no tratamento de doenças relacionadas à perda de massa muscular. Segundo revisão realizada por Sas e colaboradores (2014), a principal razão para a descontinuação do tratamento é o aparecimento de efeitos adversos, sendo o principal descrito a virilização. Em outro estudo, o hirsutismo (crescimento anormal de pelos pelo corpo) é reportado sem eventos adversos cardiovasculares importantes (Menke et al., 2010).

Levando em consideração o uso de EAA's de modo geral, devido a alguns de seus efeitos, como a melhora da composição corporal e o desempenho físico, seu uso se disseminou de forma indiscriminada (Piacentino et al., 2015; Hartgens e Kuipers, 2004; Angoorani e Halabchi, 2015). Segundo a Agência Mundial Antidoping (em inglês, WADA) desde 2017 os EAAs são considerados o grupo de substâncias mais utilizadas no processo de doping no esporte além do uso abusivo entre os jovens, o que impulsionou várias pesquisas sobre seus efeitos deletérios, sendo considerados tempo-dose dependente (Cunha, 2004; Akyurek e Dunn, 2006), dentre eles podemos destacar os cardiovasculares como hipertrofia cardíaca (Far et al., 2012), aumento da pressão arterial (Solakovic et al., 2015; Sullivan et al., 1998), infarto agudo do miocárdio e morte súbita (Frati et al., 2015; Montisci et al., 2012; Hartgens et al., 2004), com aumento de citocinas inflamatórias (Franconi et al., 2013) e estresse oxidativo (Hovatta et al., 2005). Além disso, também são observados efeitos comportamentais e dependência, pouco estudados, em especial para OXA, demonstrando a necessidade de mais estudos sobre esses efeitos, inclusive em jovens.

1.2 EFEITOS COMPORTAMENTAIS

Os EAAs possuem efeitos tanto anabólicos como androgênicos e hedônicos, que envolvem o sistema mesocorticolímbico, sistemas dopaminérgicos e comportamentos de reforço, que envolvem regiões como hipocampo, amígdala, córtex frontal, Área Tegmental Ventral (ATV), hipotálamo, *substância nigra* e *núcleo accumbens* (figura 4). Esse sistema mesocorticolímbico é responsável pelas emoções e comportamentos sociais como podemos citar sede, comportamento

sexual, medo, ansiedade, memória, mecanismos de recompensa, tomada de decisões, entre outros (Kotter e Meyer, 1992).

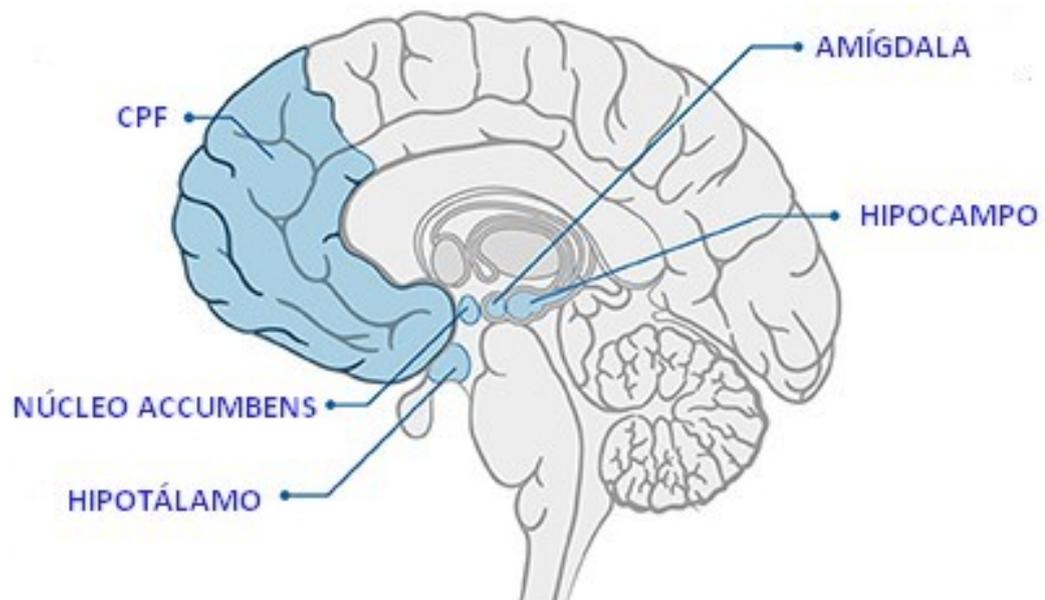


Figura 4: Representação de algumas regiões que fazem parte do sistema mesolímbico no cérebro humano, que atuam em conjunto para desenvolver as funções e atividades desse sistema.

Os usuários de EAAs podem desenvolver adicção semelhante ao de drogas de abuso como, por exemplo, dos opiáceos, a partir do reforço positivo dessa ação, pela via de recompensa, podendo levar a dependência desses anabolizantes (figura 5). Em 2014, a prevalência global de uso ilícito de EAA era de 3,3% (Sagoe et al., 2014), ao passo que entre adolescentes nos EUA 5,6% já usaram essas drogas para fins estéticos (Eisenberg et al., 2012). Entre os usuários de EAAs, 30% desenvolvem dependência (Kanayama, Pope, Hudson, 2014).

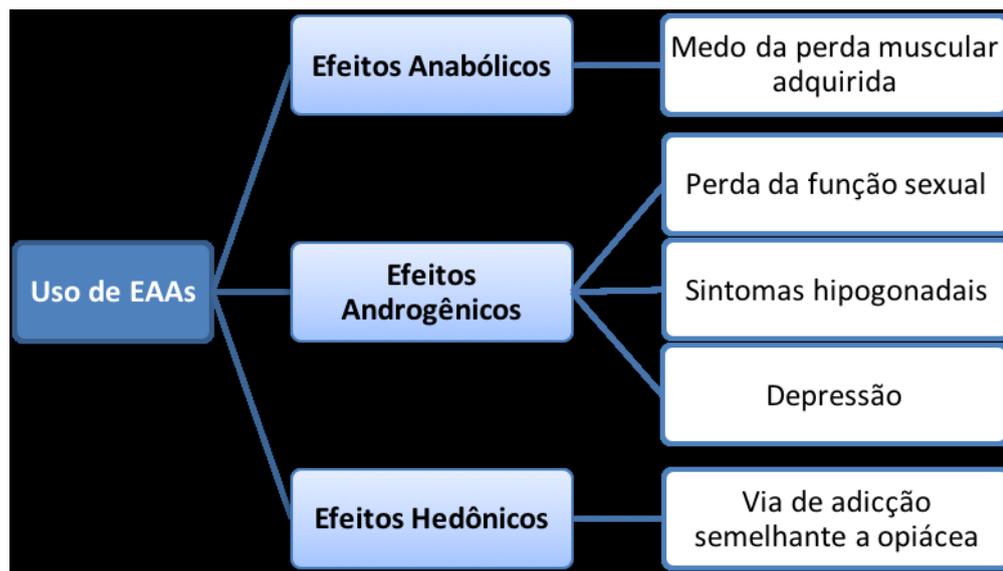


Figura 5: Esquema representativo das possíveis ações relacionadas ao uso abusivo de EAA no desenvolvimento da dependência. Modificado de Kanayama, 2015.

A ação dos EAA no sistema nervoso central (SNC), gerando comportamentos como a ansiedade (Onakomaiya et al., 2014), agressividade (Cunningham e McGinnis, 2007) e ativação da via de recompensa (Zotti et al., 2014), se dá pela ligação dos EAAs nos receptores de esteroides localizados em diversas regiões cerebrais, que é facilitado devido a característica lipofílica desses fármacos, que confere a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é uma estrutura formada por células endoteliais justapostas, que proporcionam seletividade e impedem que algumas moléculas consigam passar do sangue para o cérebro, separando o fluido extracelular cerebral da corrente sanguínea. Dessa forma, os EAAs ou seus metabólitos se ligam aos receptores de andrógenos no SNC desempenhando efeitos comportamentais, de memória e de desenvolvimento (Hampl, Bičíková e Sosvorová, 2015).

Foram amplamente descritos na literatura que os EAAs podem promover ou acentuar efeitos comportamentais tais como ansiedade, depressão, agressividade, euforia, dependência entre outros (Johnson, 1990; Bitran, 1996; Bahrke, 1990, Clark e Henderson, 2003), porém muito pouco se sabe em relação à oxandrolona,

inclusive sobre seu consumo de forma abusiva na juventude. Dentre os possíveis efeitos comportamentais relacionados a OXA, objetivamos em nosso estudo, abordar os efeitos sobre a ansiedade. A definição de ansiedade é descrita como um estado emocional aversivo, onde existe uma desproporcionalidade entre o sentimento de medo e a natureza da ameaça (Weinberger, 2001). É um desagradável estado de tensão, apreensão ou inquietude – temor que parece originar-se de perigo interno ou externo iminente, podendo ser resposta a estresse ou a estímulo ambiental que muitas vezes ocorre sem causa aparente. Esse estado emocional está relacionado a diversos transtornos psiquiátricos como ansiedade, ataques de pânico, fobias e transtorno de ansiedade generalizada.

Foi demonstrado que o uso de EAAs está diretamente relacionado ao desenvolvimento da ansiedade, que pode acontecer por diferentes vias como, por exemplo, desequilíbrio de neurotransmissores como dopamina e serotonina, pelo aumento do estresse oxidativo ou alterações bioquímicas que afetam receptores ou peptídeos onde podemos citar o Neuropeptídeo Y (NPY) presente no hipocampo ou receptor de melanocortina tipo 4 (MC4R) que é predominantemente expresso no sistema nervoso central, especialmente em regiões do cérebro responsáveis por respostas ao estresse e controle de emoções. (Selakovi, et al., 2017; Joksimovic, et al., 2019). Os EAAs causam comportamento ansiolítico tempo – dependente. (Clark, 2003; Cunha, 2004). Foi observado que a utilização de EAAs por curto período de tempo promove ação ansiolítica e por outro lado a utilização em longo prazo promove aumento da ansiedade, como por exemplo, um estudo em que os ratos foram tratados por 6 dias com proprionato de testosterona e por meio de testes comportamentais de LCE e CA, foi possível observar que esse tratamento mostrou efeito ansiolítico (reduziu a ansiedade), enquanto que os animais que foram tratados por 14 dias (~3.5 - 5 mg/kg) a ansiedade não diferia do controle (Bitran, D. 1993).

Ainda de acordo com Bitran, uma explicação para o efeito bimodal dos EAAs seria que estes inicialmente aumentam a transmissão gabaérgica, ou seja, a estimulação e a sensibilidade do receptor do Ácido gama-aminobutírico (GABA_A), causando então um efeito ansiolítico, e com o passar do tempo, devido a essa intensa estimulação, ocorreria o fenômeno de tolerância destes receptores, ou seja, redução da sensibilidade, levando a anulação do efeito ansiolítico que antes era

observada, ou até mesmo, o surgimento de comportamento ansiogênico, devida a baixa estimulação do receptor.

Uma das causas desse resultado se deve a modulação alostérica da função do receptor GABA_A pelos esteroides anabolizantes, possivelmente pela ligação desses nos sítios de neuroesteroides e seus derivados metabólicos, que residem em um dos domínios do receptor GABAérgico, indicado na figura 6. A ativação deste sítio pode induzir uma alteração conformacional no receptor, que pode aumentar ou diminuir sua função de acordo com a natureza da substância que irá se ligar (Belelli e Lambert, 2005). A ligação dos EAAs, altera as transições dele entre diferentes estados cinéticos quando um ou dois dos sítios do GABA_A estão ativados, produzindo assim a alteração da corrente de cloreto induzida pelo GABA levando a um aumento da estimulação gabaérgica (Morrow, Suzdak & Paul, 1987; Yelhekar, Druzin & Johansson, 2017), ou seja, aumentando o influxo de cloreto, consequentemente hiperpolarizando a célula e impedindo a ativação do neurônio pós sináptico.

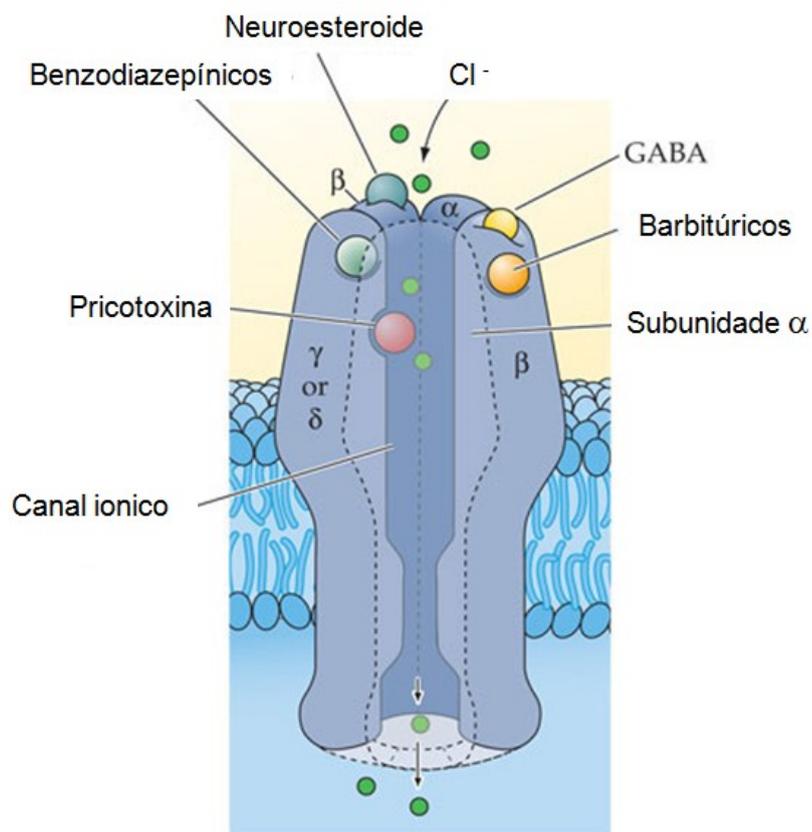


Figura 6: Modulação alostérica da função do receptor de neurotransmissores pelo EAA. Representação esquemática do receptor GABA_A. O receptor GABA_A é uma proteína pentamérica com uma estequiometria proposta de 2 α , 2 β e uma subunidade γ . Modificado de Möhler, H. (2011).

De forma interessante, foi recentemente demonstrado que a intensa estimulação dos receptores GABA_A por esteroides ou neuroesteroides por meio do sítio de ligação para neuroesteroides, podem induzir uma neuroadaptação prolongada dos neurônios dopaminérgicos da ATV (Vashchinkina et al., 2014), uma região do sistema límbico com projeções dopaminérgicas, relacionadas as vias de recompensa, podendo contribuir para processos fisiológicos ou fisiopatológicos e alterações comportamentais. Além das moléculas endógenas, os próprios metabólitos dos EAAs podem agir como neuroesteroides.

1.2 VIAS DOPAMINÉRGICAS

De fato, estudos demonstram a ação dos andrógenos sobre as vias dopaminérgicas, compostas por neurônios que produzem e liberam preferencialmente o neurotransmissor Dopamina (DA). A dopamina é uma catecolamina produzida nos terminais dos neurônios dopaminérgicos (Cooper, 1996) a partir do aminoácido Tirosina. No cérebro humano há aproximadamente 400.000 neurônios que produzem DA e são encontrados em abundâncias em determinadas regiões e distribuídos em 9 grupamentos subclassificados em vias curtas, médias e longas (Webster 2001). Essas vias (figura 7) podem ser resumidamente classificadas em principais 3 principais núcleos:

Via Nigroestriatal (representado pelo número 1 da figura 7): tem sua origem na substancia nigra e distribui para regiões subcorticais (estriado). importante via para o controle motor e a degeneração desses neurônios causa o mal de Parkinson (Cooper, 2003).

Via Mesocorticolímbica (representado pelo número 2 da figura 7): Originalmente são 2 vias, a mesolímbica e mesocortical, mas comumente citadas em conjunto (Tzschentke, 2001; Cooper 2003). Tem origem na ATV e se projetam para estruturas

subcorticais límbicas (núcleo accumbens, septum, corpo amigdalóide) e áreas corticais (córtex piriforme, córtex pré-frontal e córtex entorrinal). Considerado o centro de gratificação cerebral.

Via Tuberoinfundibular ou Hipotalâmico (representada pelo número 3 da figura 7): que se projeta dos núcleos arqueado e periventricular para o lobo intermediário da hipófise, cujo papel funcional é suprimir a liberação de prolactina (Jucaite, 2002).

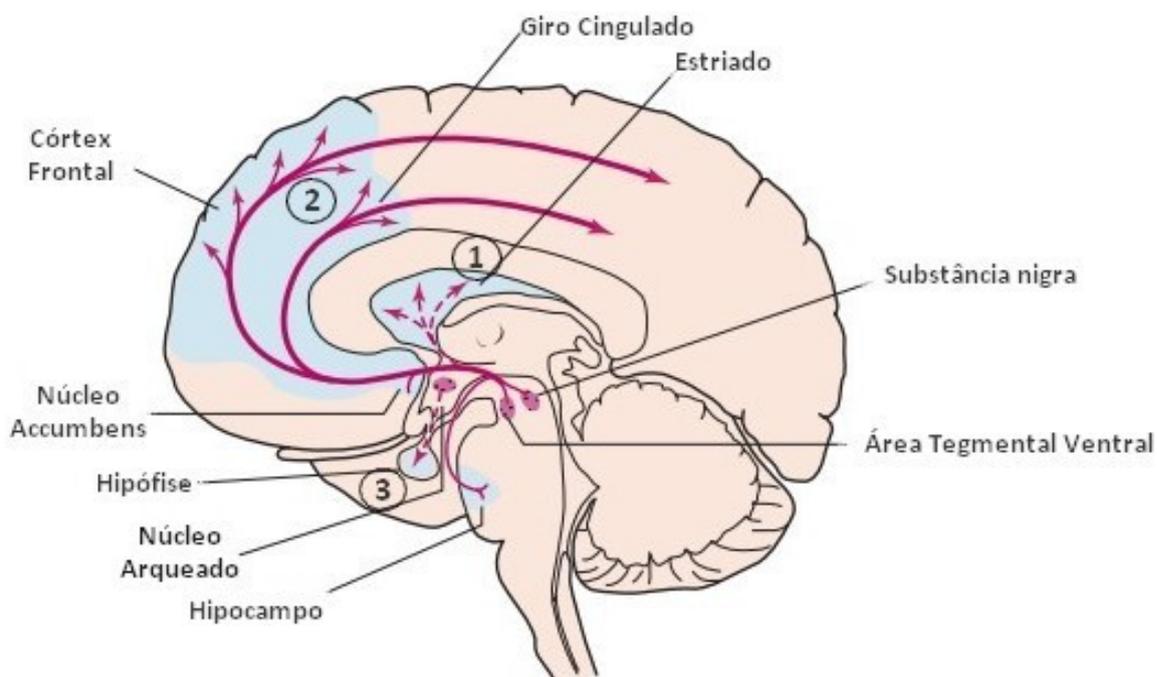


Figura 7: A três maiores projeções dopaminérgicas no SNC. (1) Via nigroestriatal: a substancia nigra projeta para o estriado dorsal; essa é a via que se degenera na doença de Parkinson. (2) A ATV projeta para o estriado ventral (núcleo accumbens), bulbo olfatório, amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, orbital e medial e giro cingulado. O termo “mesolímbico” ou “mesocortical” é usado frequentemente para descrever os componentes das projeções da ATV. (3) Projeções do Núcleo Arqueado do hipotálamo, de onde a dopamina é distribuída para a hipófise anterior, chamada de via tuberoinfundibular. Adaptado e modificado de Cooper, Bloom e Roth (2003).

De fato, essas vias, principalmente a via mesocorticolímbica, estão relacionadas a mecanismos de recompensa e de adicção, como no reforço positivo mediante o sentimento de gratificação, por exemplo, pela melhora visual do corpo, gerando aumento momentâneo de dopamina, conhecido como via hedônica (Tobiansky et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que os esteroides / neuroesteroides podem agir diretamente tanto de forma aguda quanto prolongada, sobre as vias dopaminérgicas (Pont et al., 2002).

Nesse sentido, Pont et al. (2002) usando microinjeções intracerebroventriculares do neuroesteroide alopregnona observou aumento da liberação de DA no núcleo *accumbens*. Em relação aos mecanismos de longo prazo, além da neuroplasticidade de neurônios dopaminérgicos na ATV demonstrada por Vashchinkina et al., (2014), também foi observado que o uso de EAA pode levar a redução da Monoamina oxidase (MAO), uma das enzimas que é responsável pela degradação da DA, no *caudado putâmen* e amígdala, ou seja, induzindo um aumento da biodisponibilidade de dopamina (Birgner, 2008). Adicionalmente, Jardi et al., (2018) estudando os efeitos da reposição de andrógenos em camundongos, observaram o efeito sobre a estimulação da atividade física, com modificação do nível de transcrição gênica do Receptor de Dopamina do tipo 1 (DrD1), Receptor de Dopamina do tipo 2 (DrD2) e MAO-a (Jardi et al, 2018).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E VIA INFLAMATÓRIA

Além do mecanismo envolvendo as vias dopaminérgicas, desde 2002 estudos sobre mecanismos e transtornos que envolvem ansiedade começaram a apontar o envolvimento do sistema oxidativo na regulação da ansiedade (Kuloglu et. al., 2002), o que que permitiu vários estudos posteriores sobre essa conexão (Hovatta et. al., 2005; Bouayed, Rammal e Soulimani, 2009; Rammal et. al., 2008).

De acordo com Rammal et al., 2008, o cérebro é considerado um órgão bem suscetível ao estresse oxidativo, pelo fato de ter alto consumo de O₂ e relativamente baixa defesa antioxidante e característica lipídica, dessa forma, espécies reativas de oxigênio, tais como superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peróxido nitrito (ONOO⁻), podem promover peroxidação lipídica, podendo ocasionar diversos tipos

de efeitos negativos e doenças, entre elas, disfunção mitocondrial, Parkinson, transtorno de pânico, depressão, fobia social e transtorno de ansiedade (Hassan et al., 2014; Krolow et al., 2014). Porém, o organismo conta com uma proteção ao estresse oxidativo mediado por enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que visam neutralizar as Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs) (Touyz et al., 2004). Inclusive, a própria MAO, enzima atuante na via dopaminérgica, pode induzir o estresse oxidativo, como por exemplo, formando H_2O_2 , uma substância com características pró-oxidantes (Bortolato, Chen & Shih, 2008).

As espécies reativas de oxigênio interagem com outras moléculas como proteínas, lipídios e DNA gerando biotransformação das mesmas. Por exemplo, quando EROs reagem com proteínas, pode levar a quebra de reações enzimáticas ou alterações na sua estrutura. Interagindo com lipídios, pode oxidar ainda mais os ácidos graxos presentes em volta numa reação em cadeia. Já com o DNA, sua interação causa mutações gênicas que podem ter impacto na sua replicação. Além de possuírem a capacidade de romper a membrana celular ou de organelas (Andersen, 2004). O desequilíbrio das enzimas antioxidantes, que agem como mecanismos reparadores do estresse oxidativo atenuando esses efeitos e equilibrando a degradação das EROs, tem sido relacionada a várias desordens psicológicas, por exemplo, quando há redução dessas enzimas ou da sua atividade (Kuloglu et al., 2002).

Evidências encontradas na literatura relatam um aumento tanto de espécies reativas ao oxigênio com consequente aumento de enzimas antioxidantes derivados do uso de EAA. Usuários de EAA de forma regular se voluntariaram para um estudo realizado por Arazi, Mohammadjafari e Asadi em 2017, e foi observado que estes fornecem um estresse oxidativo sustentado quando comparado a não usuários. A presença constante de estresse oxidativo induz o aumento de enzimas antioxidativas para tentar reestabelecer o equilíbrio do sistema REDOX.

Além disso, existem trabalhos que mostram o envolvimento estresse oxidativo com as vias inflamatórias, já que o aumento de EROs (que possivelmente é alterado com a exposição de EAAs) pode levar a danos celulares com consequente aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no SNC (figura 8) com alterações de comportamento e humor, como a depressão,

envolvendo vias oxidativas e peroxidação lipídica (Maes, 1999). Evidências crescentes demonstram que os pacientes afetados pela depressão exibem aumento significativo nos marcadores imunoinflamatórios (Bottiglieri, 2000). Por sua vez, a neuroinflamação eleva a produção de EROs e promove estresse oxidativo, gerando danos celulares e conseqüentemente leva a inflamação, formando um loop, envolvendo citocinas como TNF- α , (Fischer & Maier, 2015) e também a proteína reguladora de transcrição Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) que são produzidas por diversos tipos de células, inclusive neurônios e células da glia no sistema nervoso central (Tchelingerian et al., 1993).

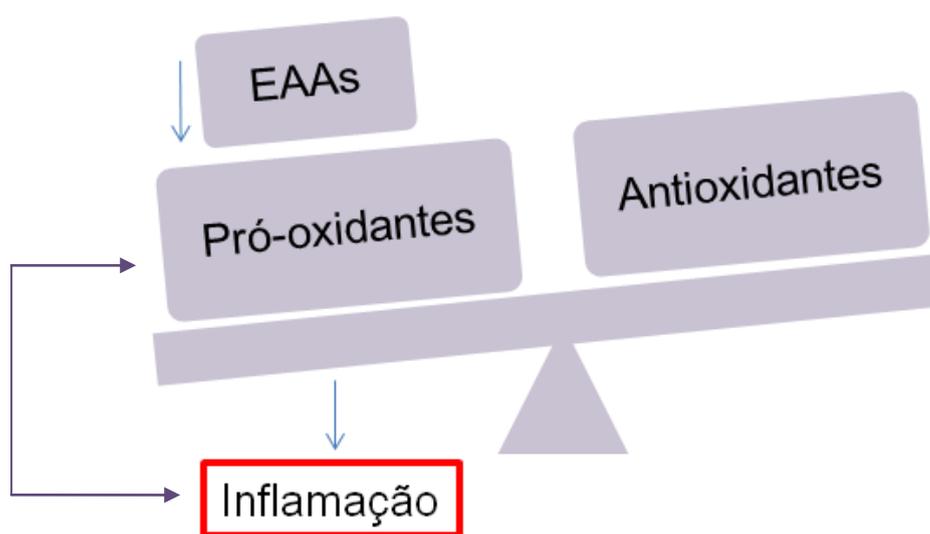


Figura 8. Representação da influência do uso de EAA promovendo desequilíbrio oxidativo pelo aumento de substâncias pró-oxidantes induzindo o aumento de citocinas inflamatórias, gerando inflamação. Fonte: Acervo pessoal.

Mediante o pouco conhecimento que se tem dos efeitos comportamentais da OXA em especial em jovens e em uso abusivo, a nossa hipótese é que seu uso em dose de abuso pode alterar o comportamento ansioso em ratos jovens, mas que não apresente alteração em dose semelhante à terapêutica, envolvendo mecanismos antioxidantes, inflamação e alterações nas vias dopaminérgicas.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi avaliar os efeitos de dose semelhante à terapêutica e de abuso de oxandrolona sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e neuroinflamatórios em ratos jovens.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com oxandrolona:

- ◆ Na ansiedade, utilizando os testes comportamentais funcionais:
 - Labirinto em Cruz Elevada
 - Campo Aberto
- ◆ Os mecanismos que possam estar envolvidos nas alterações comportamentais em relação à expressão das proteínas:
 - Enzimas antioxidantes (SOD e CAT)
 - Receptor de Dopamina do tipo 2 (DrD2)
 - Citocina inflamatória (TNF- α)

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 10/2016.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com 30 dias de idade, e peso inicial variando entre 80g-100g. Os animais utilizados foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno (5 por gaiola), com umidade (50%) e temperatura (22°C) controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, além de acesso à água e ração *ad libitum*.

3.2 DROGA

Para a realização do experimento, foi utilizado Oxandrolona 20mg/ml (Manipula – farmácia de manipulação) em suspensão oral, respeitando a dose diária de acordo com o peso do animal. Como veículo, foi utilizado carboximetilcelulose (CMC) 0,5% diluído em água, com dose diária de 0.1ml por rato.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados de modo aleatório em 3 grupos experimentais e tratados por 4 semanas (figura 9).

Grupo controle (CON): foram tratados com 0,1ml de CMC 0,5%, por gavagem, uma vez ao dia.

Grupo Dose Similar Terapêutica (DT): tratado com oxandrolona 2,5 mg/kg/dia, por gavagem, uma vez ao dia.

Grupo Dose de Abuso (DA): tratado com oxandrolona 37,5mg/kg/dia, por gavagem, uma vez ao dia.

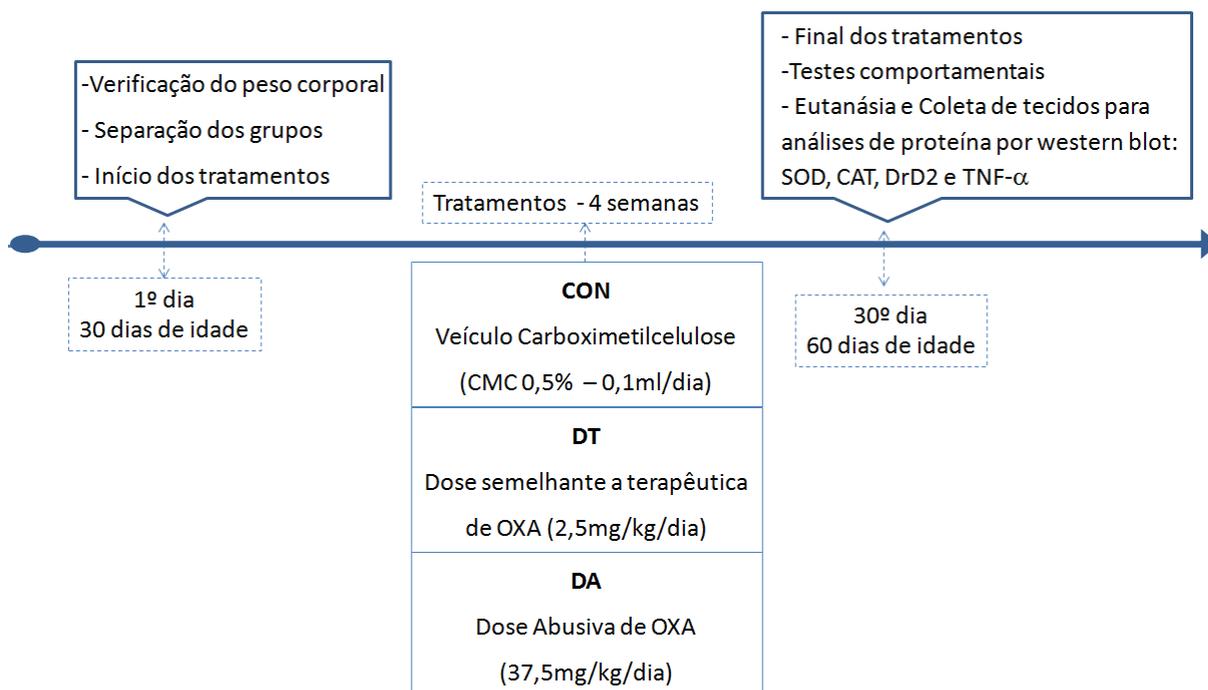


Figura 9: Resumo do protocolo experimental. Acervo pessoal.

A dose similar a terapêutica (DT) foi determinada a partir da dose utilizada em humanos (0,06 mg/kg/dia; Menke et al., 2009) sendo adaptada para animais (Reagan- Shaw, Nihal e Ahmad, 2007).

A dose de abuso foi determinada no presente estudo como sendo 15 vezes a dose terapêutica, uma vez que a literatura considera como dose de abuso um valor entre 10 a 100 vezes a dose terapêutica (Brower, 2002).

Os animais foram pesados duas vezes por semana desde o primeiro até o último dia de tratamento para avaliar o peso corporal e para ajuste das doses.

Todos os animais realizaram os testes comportamentais ao final do tratamento e posteriormente foram sacrificados por decapitação com guilhotina para a retirada do córtex pré-frontal (CPF), amígdala e hipocampo, que foram alocados em eppendorfs individuais, temporariamente em gelo seco e subsequentemente armazenados no freezer a -80°C .

3.4 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

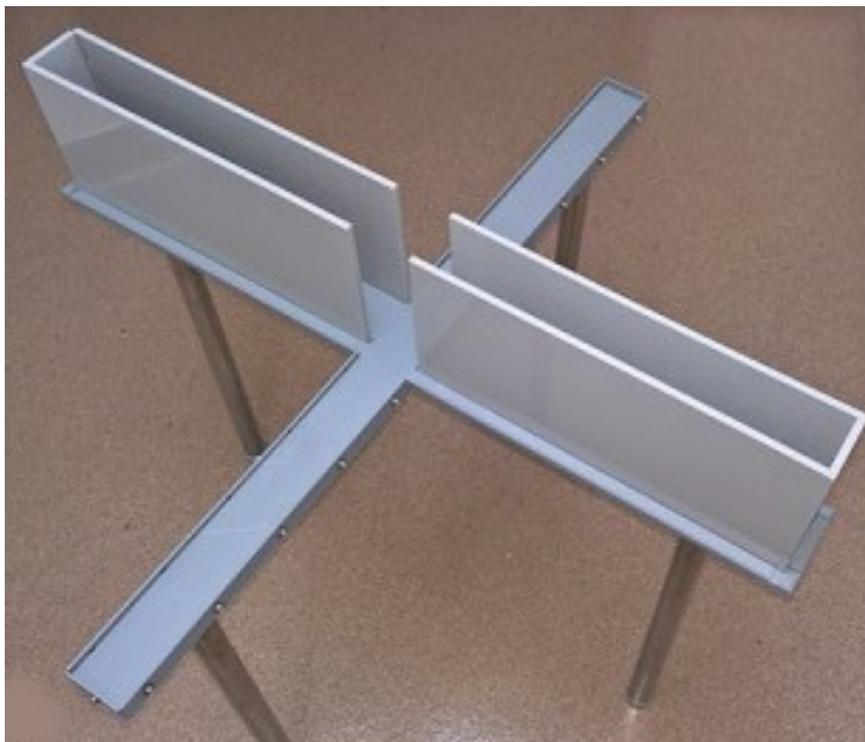


Figura 10: Imagem representativa de um LCE composto por dois braços fechados e por dois braços abertos onde o rato tem seu teste gravado por 5 minutos para análise posterior. Adaptado de Tucker e McCabe, 2017.

O teste de labirinto em cruz elevado foi descrito por Handley e Mithani, 1984, onde o tempo gasto ou número de entradas no braço fechado, quando estes forem maiores que no braço aberto, entre outros parâmetros representam um comportamento mais aversivo a exposição, visto que o rato é um animal exploratório que evita ambientes onde pode ficar exposto á predadores (braços abertos), portanto é considerado um comportamento mais ansioso (Handley e Mithani, 1984).

Idealizado para avaliar a ansiedade animal, o aparelho utilizado consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 x 1cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), também opostos, sob a forma de uma cruz grega, ligada por uma plataforma central (10 x 10 cm) 50cm acima do nível do chão. O teste foi conduzido sob uma luz vermelha difusa (5 lux). Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento foi observado durante 5 minutos.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

1. Número de entradas no braço fechado;
2. O tempo gasto no braço fechado;
3. Número de entradas nos braços abertos;
4. Tempo gasto nos braços abertos.

3.5 TESTE COMPORTAMENTAL DE CAMPO ABERTO (CA)

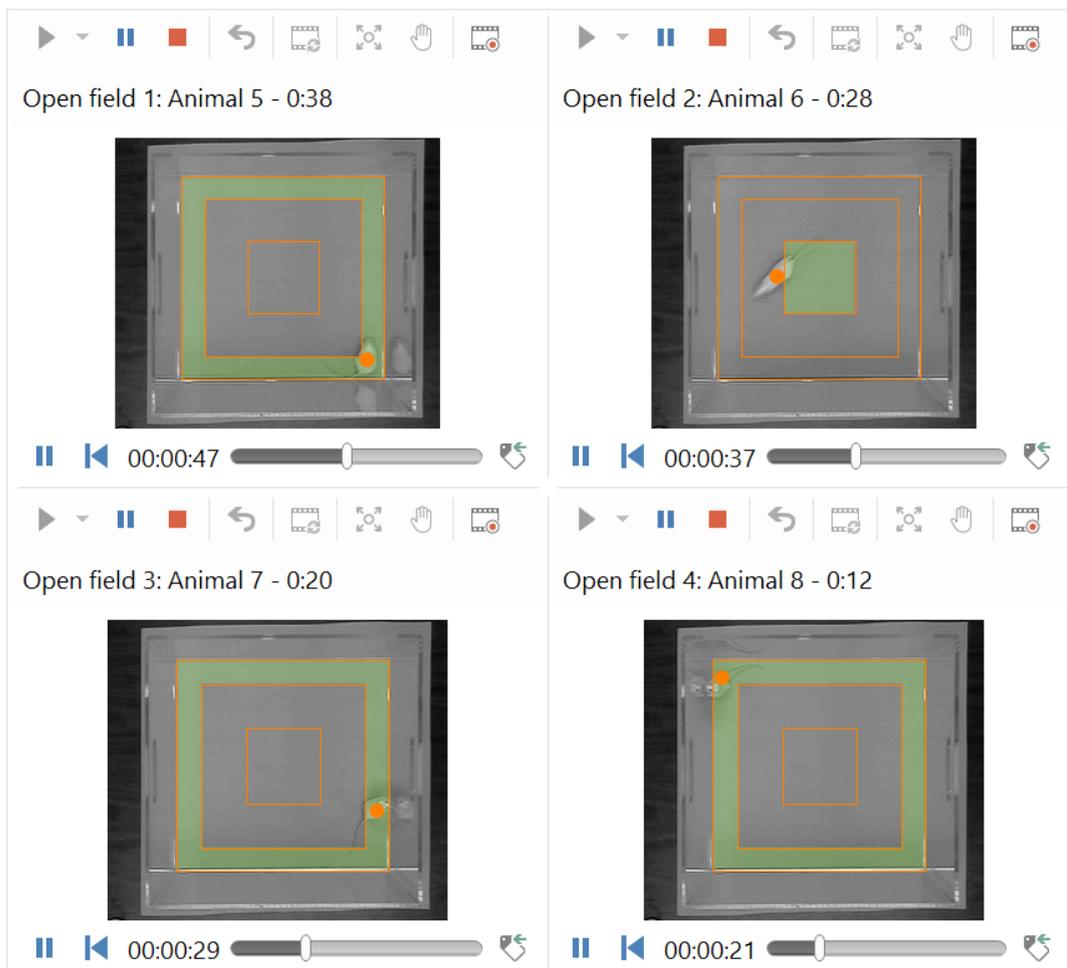


Figura 11: Imagem demonstrativa do teste de Campo Aberto a partir do programa AnyMaze utilizado para análise das gravações do teste. As áreas em verde delimitam a região central do CA ou a periferia, regiões que são consideradas para a análise do comportamento dos ratos. Fonte: Site do AnyMaze.

O teste avalia a atividade locomotora e se baseia em um campo aberto quadrangular (100 x 100 x 30cm) dividido em área central e a área de periferia para avaliar a atividade exploratória dos animais. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto no começo do teste e os seguintes parâmetros foram registrados por 5 minutos:

- Atividade locomotora - distância total percorrida em todo o campo;
- Atividade locomotora – o número de vezes em que o animal invade com as quatro patas uma das áreas da arena;
- Atividade locomotora – a distância percorrida em cada área do campo separadamente;
- Tempo gasto em cada área do campo.

Todos os protocolos foram descritos por Calvin Hall em 1934, que descreveu os resultados da diminuição da atividade exploratória como comportamento semelhante ao ansioso, assim como maior tempo gasto na periferia do campo evitando a exposição a possíveis predadores.

3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para detecção da expressão das proteínas DrD2, SOD, CAT e TNF- α nas amostras das áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipotálamo e amígdala).

Para amígdala e córtex pré-frontal, duzentos miligramas de cada tecido e para o hipocampo, duzentos e cinquenta miligramas, foram homogeneizados separadamente em tampão de lise (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de Na₄P₂O₇.10H₂O, 1 mmol / L de MgCl₂, 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na₃VO₄). As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Cinquenta microgramas de proteína de amígdala e cortex pré-frontal e oitenta microgramas da amostra do hipocampo foram diluídos em tampão (5 \times - 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e foram separados por eletroforese

usando SDS-PAGE (Figura 12).

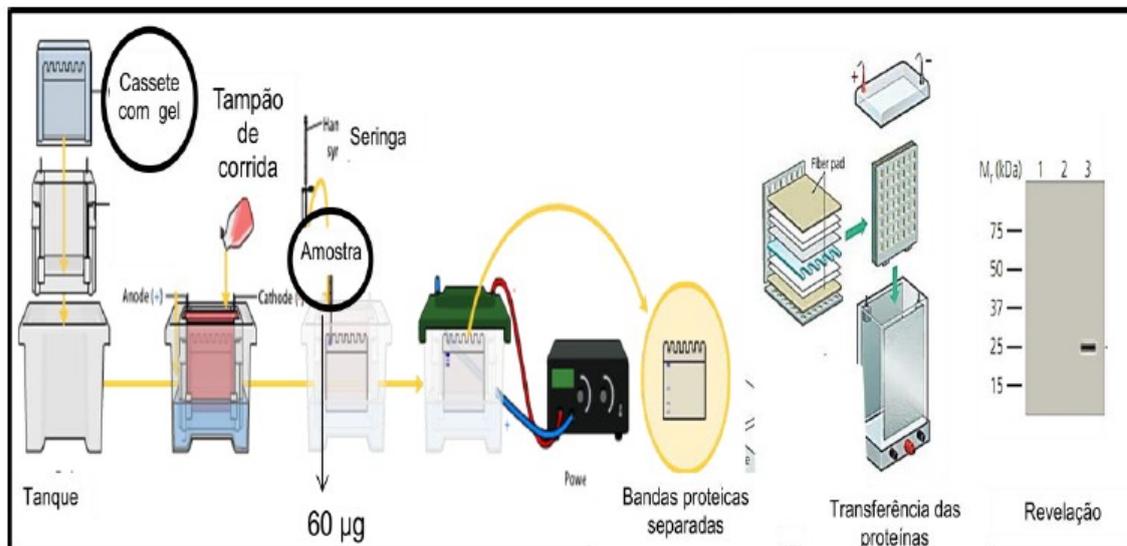


Figura 12: Esquema global de uma eletroforese em gel. Fonte: Adaptado e modificado de <http://www.creative-diagnostics.com/Sample-Gel-Preparation.htm>.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad). Após incubação com solução de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween a 0,05% e albumina a 4%), as membranas foram incubadas a 4°C, durante a noite com anticorpos primários específicos: anti-SOD2 ([1:4000], BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), anti-Catalase ([1: 14.000], Sigma, St. Louis, MO, EUA), anti-DrD2 ([1:1000], Alomone, Jerusalém, ISR) e anti-TNF- α ([1:200], Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas (5 min, três vezes) e incubadas durante uma hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:5.000]: anti-IgG *mouse* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) anti-IgG *rabbit* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (*Luminata HRP Substrate-Millipore*) e a reação foi captada em um sistema Bio-Rad ChemyDoc e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 6.0.1.34. Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle, sendo realizada com a proteína GAPDH com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos como percentual (%) do controle.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

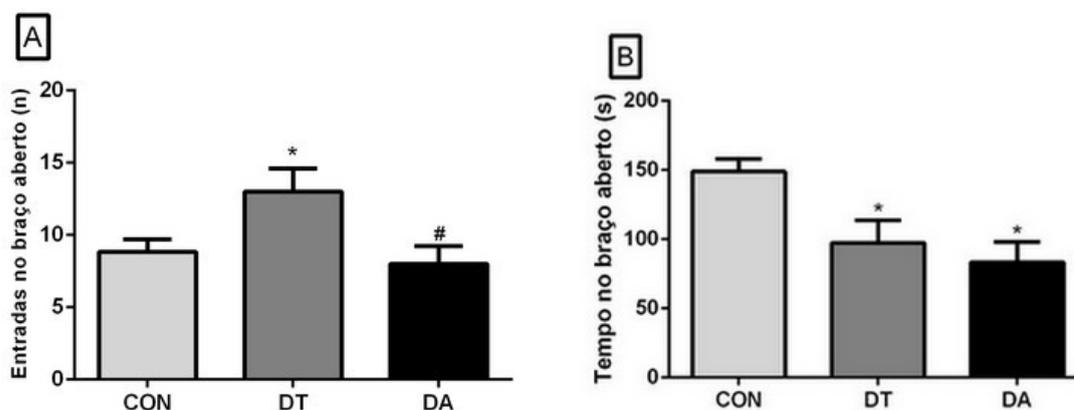
Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 6 e foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste de *Fischer LSD post hoc*, devido a sua sensibilidade para testes como os que foram realizados e considerado como significativo o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Na avaliação comportamental de ansiedade por meio do teste de Labirinto em Cruz Elevada (LCE) o grupo DT apresentou aumento no número de entradas no braço aberto comparado com o grupo controle (Figura 13A - CON: 8.8; DT: 13.0; DA: 8.0), enquanto o grupo de dose abusiva não apresentou alteração. Entretanto, em comparação com o grupo DT, houve um menor número de entradas no grupo DA (figura 13A).

No entanto, ambos DT e DA apresentaram menor tempo gasto no braço aberto comparado aos valores do grupo controle (figura 13B - CON: 148.8; DT: 97.5; DA: 83.4; em segundos). Como consequência, o tempo percentual no braço aberto é significativamente menor nos dois tratamentos, comparados ao controle (Figura 13C - CON: 51.2; DT: 32.5; DA: 27.8).

O número de entradas e o tempo nos braços fechados do LCE também foram alterados pelo tratamento. Os valores de DA foram menores que os dos grupos CON e DT (figura 13D - CON: 21.9; DT: 18.3; DA: 8.1), não havendo diferença entre o grupo controle e o DT. Ao mesmo tempo, DT e DA aumentaram o tempo gasto no braço fechado em comparação com o controle (Figura 13E - CON: 127.1; DT: 173.3; DA: 192.6; em segundos).



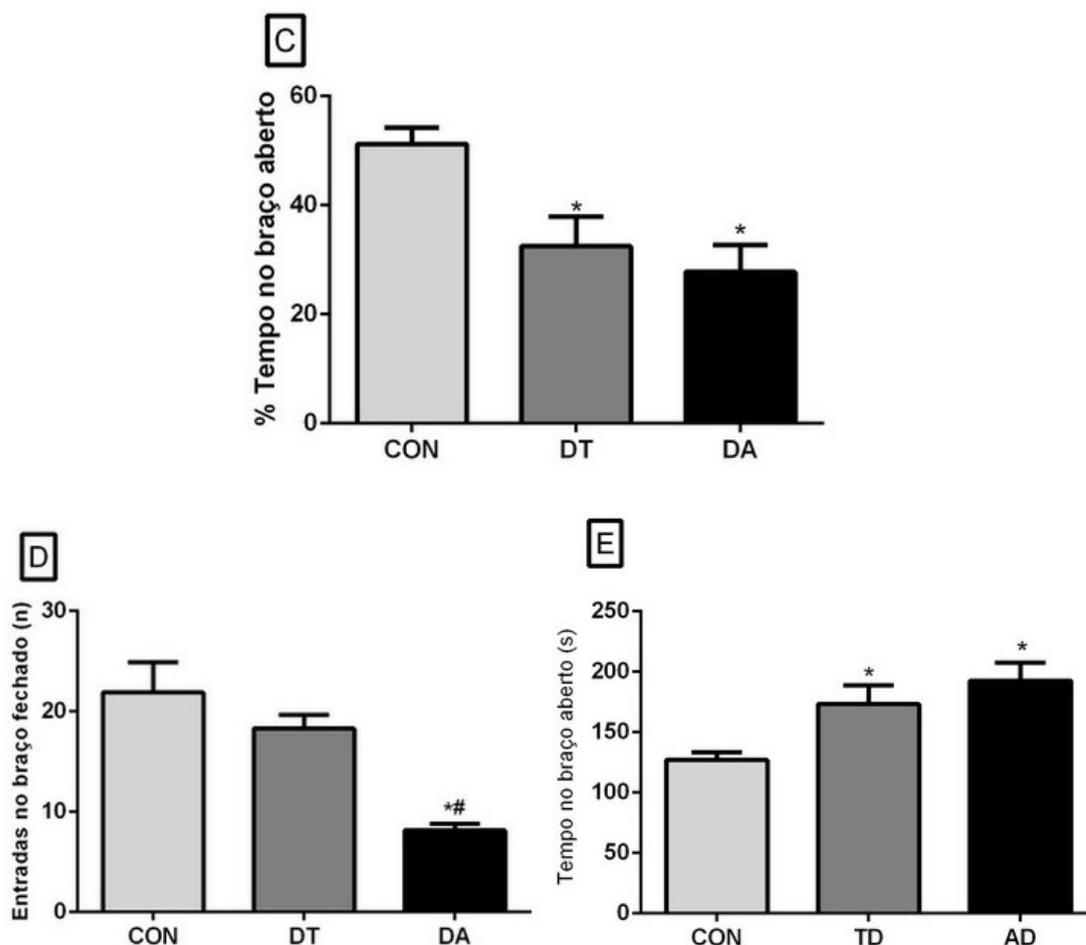


Figura 13: Efeito dos tratamentos no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos ou fechados do LCE. Os dados são expressos como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs. CON; # $p < 0,05$ vs. DT. N=10

Para aprofundar esses achados, realizamos o CA como um teste complementar. Corroborando os dados do LCE, o DT diminui o tempo gasto no centro comparado ao controle (Figura 14A - C: 34.0; DT: 16.4; DA: 27.1; em segundos), porém, sem alteração no grupo DA. No entanto, não foram obtidas diferenças entre os grupos nos demais parâmetros (figura 14B-D) no tempo gasto na periferia (CON: 268.4; DT: 278.8; DA: 268.8; em segundos), na distância percorrida no centro (CON: 1.4; DT: 1.4; DA: 1.4; em metros) e nem na distância em geral (CON: 9.9; DT: 9.9; DA: 9.7; em metros).

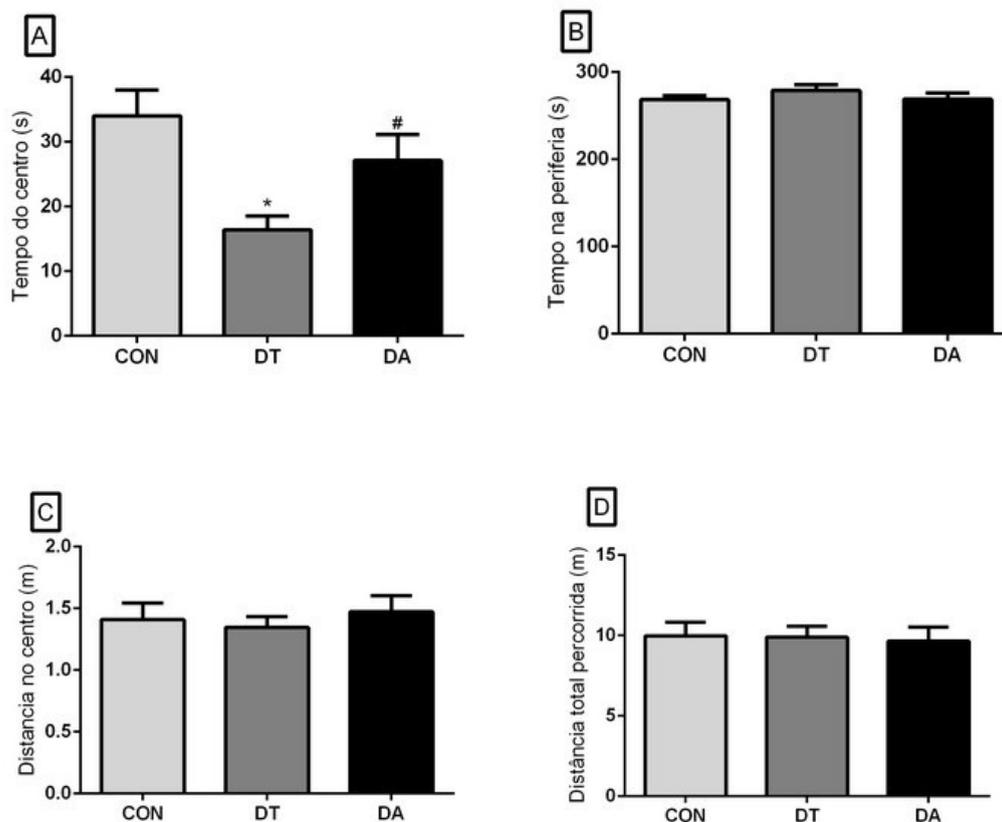


Figura 14: Efeito do tratamento dos testes de LCE e CA. Não há mudanças na distância geral e o centro do teste e no tempo gasto na periferia, mas há diferença no tempo gasto no centro pelo DT comparando com CON e DA. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. CON; # $p < 0,05$ vs. DT. N=10

Como observado na figura 15, foi avaliado a expressão DrD2 no hipocampo e na amígdala, não havendo diferença significativa entre os grupos, embora tenha uma tendência ($p < 0,054$) de aumentar a expressão desse receptor na dose abusiva no hipocampo (Figura 15A). Em nosso estudo, na avaliação desse receptor no CPF não foi possível detectar sinal dessa proteína em nossas amostras, o que acreditamos ser devido à técnica utilizada que não apresentou sensibilidade suficiente.

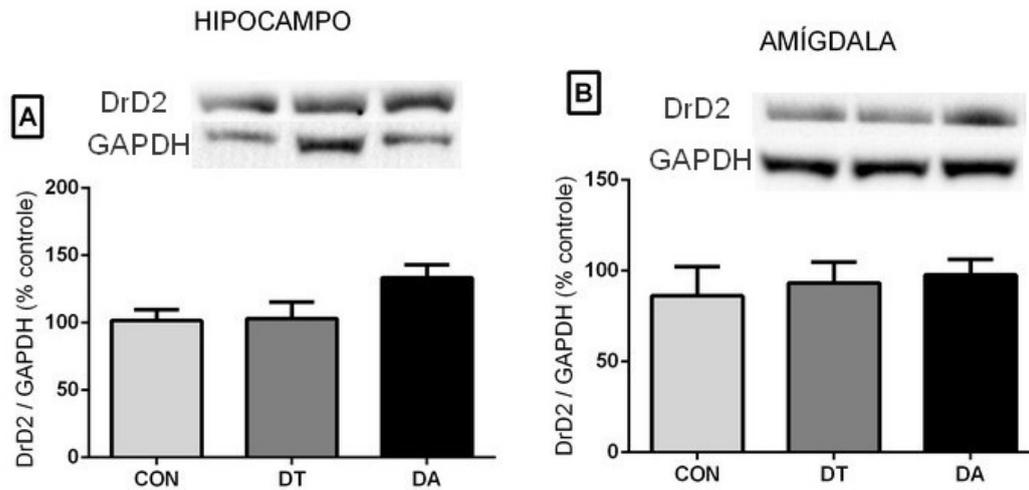


Figura 15: Efeito dos tratamentos na expressão do DrD2. Painel (A) expressão de receptor de dopamina do tipo 2 (DrD2) no hipocampo. Painel (B) expressão de DrD2 na amígdala. O sinal de cada proteína foi normalizado pela respectiva quantidade de GAPDH. Os dados são expressos como a média \pm EPM; N=6.

As enzimas antioxidantes foram analisadas no hipocampo, na amígdala e no córtex pré-frontal. A Figura 16 mostra que a expressão dessas enzimas foi diferente entre os grupos apenas no hipocampo de acordo com a dose de tratamento. DA apresentou menor nível de SOD em relação ao DT, mas nenhum dos grupos tratados foi diferente do grupo CON (figura 16A). Neste núcleo, a expressão da proteína CAT foi aumentada em DT quando comparada com os valores CON (figura 16B). Por outro lado, o grupo DA apresentou valores semelhantes ao grupo CON e menores que o grupo DT. Não houve diferença entre os grupos nas demais áreas estudadas (figura 16 C-F).

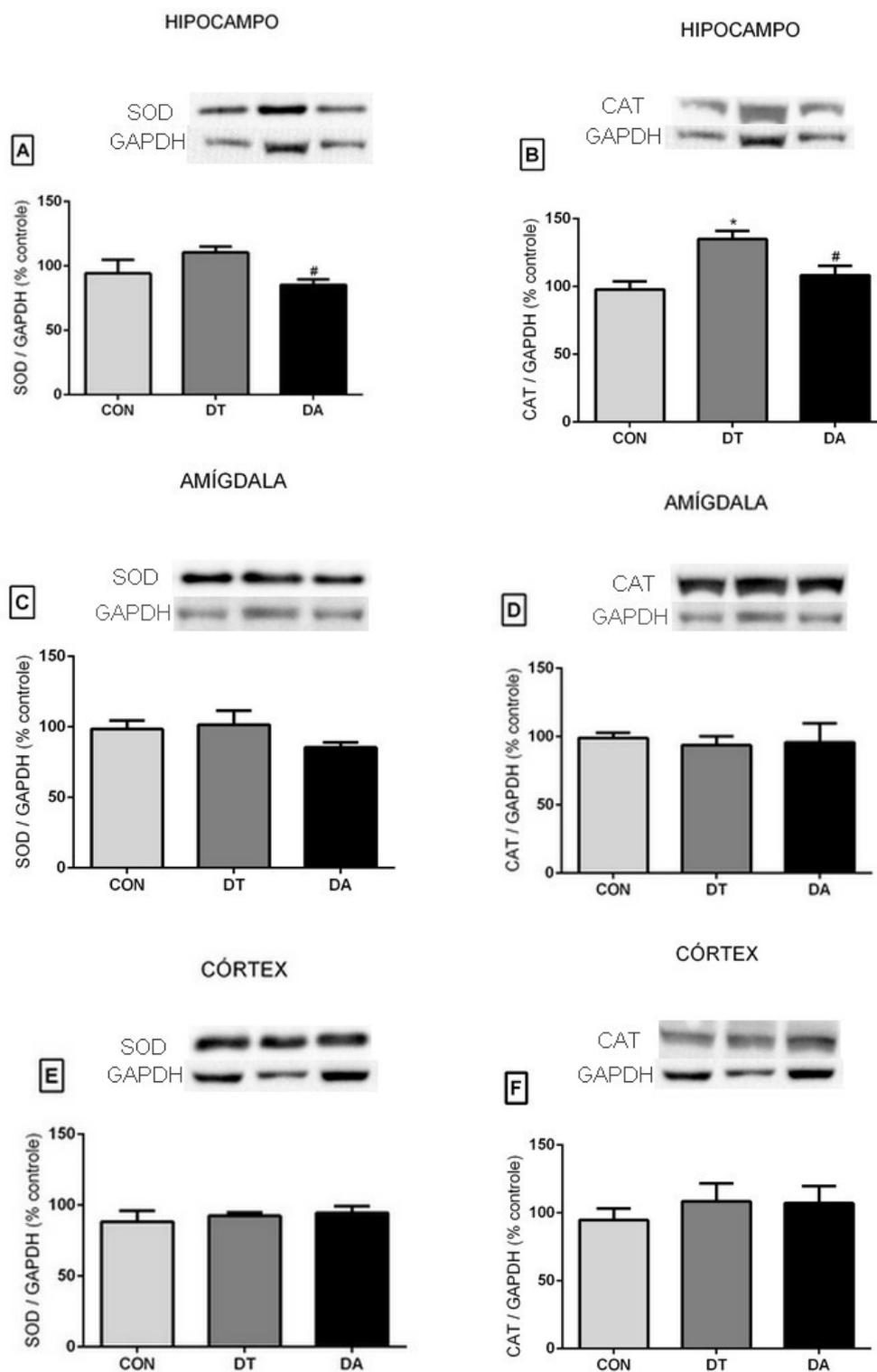


Figura 16: Efeito dos tratamentos na expressão das proteínas SOD e CAT. Painel (A, C e E) SOD, painel (B, D e F) CAT. Nos painéis superiores, imagens representativas. O sinal de cada proteína foi normalizado pela respectiva quantidade de GAPDH. Os dados são expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. CON; # $p < 0,05$ vs. DT. N=6

Assim como o gráfico representado na figura 17, a expressão da citocina inflamatória TNF- α não foi alterada entre os grupos independente da dosagem do tratamento e região estudada.

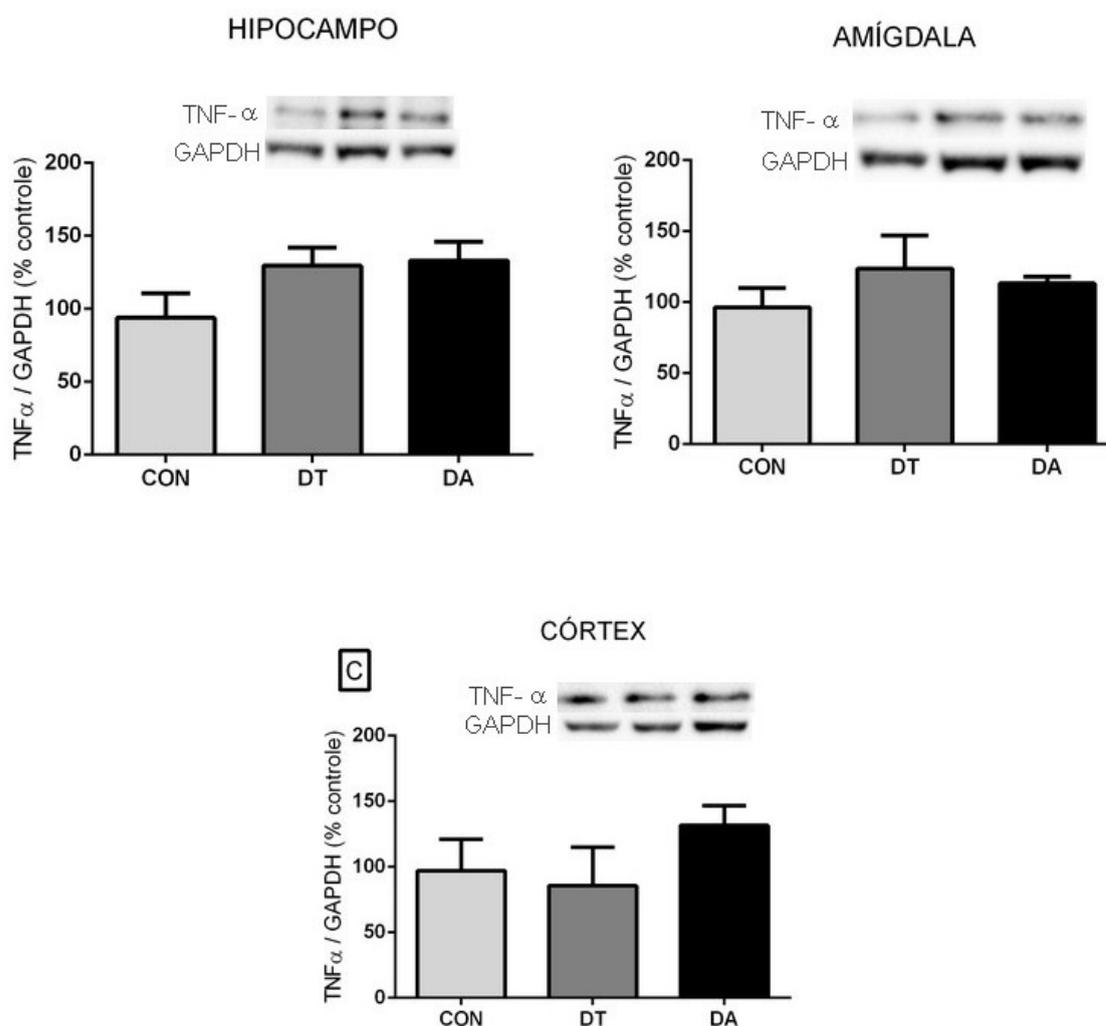


Figura 17: Efeito dos tratamentos na expressão da proteína TNF-a no hipocampo, amígdala e córtex. Painel (A) Hipocampo, painel (B) Amígdala. Painel (C) Córtex. Nos painéis superiores, imagens representativas. O sinal de cada proteína foi normalizado pela respectiva quantidade de GAPDH. Os dados são expressos como a média \pm EPM. Número de animais por grupo: 6

5 DISCUSSÃO

O resultado do teste de LCE evidenciou um efeito ansiogênico nos ratos que tiveram tratamento com o OXA em ambas as doses. Adicionalmente, o teste de CA corroborou esse achado do LCE no grupo DT, mas, curiosamente, não para o grupo DA. Essa interpretação está baseada no protocolo do teste, que caracteriza o animal com comportamento mais ansioso quando passa mais tempo nos braços fechados do LCE ou na periferia do CA (Clark, 2003; Handley e Mithani, 1984; Olivares et. al. 2014). Na literatura, podemos observar os EAAs podem agir diferentemente na ansiedade.

Em estudo realizado por Minkin et al (1993) com ratos Long-Evans machos, tratados com nandrolona 10 ou 50mg/semana por 8 semanas, observou-se que havia efeito ansiogênico no teste de CA, independente da dose, semelhante aos nossos resultados do LCE, apesar de termos encontrado diferença entre as doses no CA. Por outro lado, Bing et al. (1998) avaliou a ansiedade pelo teste de conflito (Vogel) em ratos Wistar machos, tratados com implante de testosterona (dose próxima à fisiológica) durante 8 semanas e um segundo experimento que teve um tratamento agudo de 5mg/kg 24 horas antes do teste. Nesse estudo, os dois tratamentos apresentaram efeito ansiolítico.

Como revisado por Clark et al, (2003) esses efeitos na ansiedade podem ser de forma tempo-dependente como foi possível demonstrar com os experimentos de LCE e CA realizados por Bitran et al (1993) com ratos - Long – Evans machos, entre 60 – 70 dias de idade, tratados com Testosterona (~3,5 – 5 mg/kg/dia); quando tratados por 6 dias obteve como resultado uma redução da ansiedade, e de forma contrária, quando tratados por 14 dias observou-se um aumento da ansiedade, sendo assim, os nossos achados com 30 dias está de acordo com os resultado por ele encontrados em relação ao maior tratamento (Bitran et al., 1993).

Além disso, alguns trabalhos demonstraram efeito dose-dependente, como foi relatado no estudo com camundongos machos tratados agudamente com injeção intraperitonal de neuroesteroide pregnenolona (PREG) ou sulfato de pregnenolona (PREGS) na faixa de 0,01 até 100ug/kg, 20 minutos antes da realização dos testes de LCE e CA. O resultado observado com a PREG foi a indução de efeito

ansiolítico nas doses 0,01 e 100ug/kg, o que se aproxima dos resultados observados no nosso estudo. No entanto, quando eles avaliaram PREGS, este apresentou efeito paradoxal, sendo ansiogênico quando aplicado nas doses de 1 ou 10ug/kg, e ansiolítico na dose de 0,1ug/kg (Melchior, Ritzmann,1994), sem efeito nas demais doses. Esse estudo também evidencia que o efeito pode variar de acordo com a droga utilizada, mesmo que ele tenha utilizado doses iguais.

O efeito ansiogênico que foi observado no presente estudo pode estar relacionado a ação direta ou indireta do esteroide oxandrolona e/ou seus metabólitos na via dopaminérgica, pois como foi demonstrado por Vashchinkina et al (2014), os neuroesteroides podem induzir uma neuroadaptação prolongada nesses neurônios. Essa hipótese poderia contribuir para a explicação dos efeitos tempo-dependente que foram observados no estudo de Bitran et al. (1993) citado anteriormente, podendo haver uma relação com o tempo necessário para que ocorra a neuroadaptação das vias dopaminérgicas da ATV. Ademais, estudos realizados com animais jovens demonstram que efeitos comportamentais dos EAAs, como ansiedade e depressão podem permanecer mesmo após a interrupção do tratamento (Kalinine et al., 2014; Rainer et al., 2014; Cunningham e McGinnis, 2007; Schwartzer et al., 2009).

Na avaliação relacionada à via dopaminérgica feita com a análise de expressão proteica do receptor DrD2, o resultado, apesar de não apresentar diferença significativa, mostrou uma tendência de aumento no hipocampo na dose abusiva, mas não na dose semelhante à terapêutica, e sem alterações na amígdala e CPF independente da dose. Nesse sentido, Tyson et al. (2014), utilizando ratos da linhagem Sprague-Dawley castrados com 45 dias de idade, que receberam implante de testosterona ou dihidrotestosterona (DHT) por 2 semanas, alcançaram concentrações plasmáticas de aproximadamente 10 a 100 vezes a dosagem fisiológica, e demonstrou que o tratamento aumentou a expressão gênica do DrD2, enzimas de degradação MAO e Catecol O-Metiltransferase (COMT), transportadores de dopamina (DAT) e enzima de formação de catecolaminas, a tirosina hidroxilase (TH), presentes na *substância nigra*, enquanto nenhuma dessas alterações foram observadas no estriado dorsal (Purves-Tyson 2012, 2014). Esse aumento de DrD2 na *substância nigra*, se assemelha aos nossos resultados em relação a expressão proteica do DrD2 no hipocampo.

Em paralelo ao estudo anterior, Jardi et al., (2018) utilizando camundongos com 16 semanas observou que apesar da castração não ter promovido efeito na concentração de dopamina no estriado, a reposição hormonal com implante de testosterona ou DHT aumentou o nível de transcrição gênica do DrD1, DrD2 e MAO-a. Já em animais desprovidos do receptor AR (knockout – ARKO) houve uma redução de dopamina. Nesse mesmo estudo, a testosterona estimulou a realização de atividade física, que parece envolver as vias dopaminérgicas, tanto em animais castrados quanto ARKO (Jardi et al., 2018). Nesse caso, a transcrição dos receptores de dopamina e da MAO-a foram alteradas pela presença de doses exógenas de testosterona, já que em camundongos ARKO houve redução da dopamina, pode se inferir que a dopamina tem uma relação direta com esse hormônio sexual, assim como a motivação para atividades físicas. Em nosso estudo, abordamos a relação que a oxa pode exercer sobre a dopamina quando levamos em consideração o efeito ansiogênico que foi observado.

Além dos efeitos em longo prazo dos EAAs, também foram observadas ações rápidas nas vias dopaminérgicas, como mostrado por Pont et al. (2002) usando microinjeções intracerebroventricular do neuroesteroide alopregmolona onde observou aumento da liberação de DA no núcleo *accumbens*. Adicionalmente, foi observado no estudo de Birgner (2008) realizado com decanoato de nandrolona (Deca) durante 14 dias com dose baixa (3mg/kg) e dose alta (15mg/kg) que o uso de EAA pode levar a redução da MAO no *caudado putâmen* e amígdala, induzindo um aumento da biodisponibilidade de dopamina (Birgner, 2008).

Um ponto importante a se destacar é que essas alterações promovidas pelos EAAs podem ocorrer de forma região-dependente, como visto em um estudo realizado por Kindlundh et al., (2001) com a administração de 15mg/kg de nandrolona em ratos Sprague-Dawley por 15 dias via injeção intramuscular onde foi observado diminuição dos DrD1 no *caudado putâmen* e núcleo *accumbens* e diminuição do DrD2 no núcleo *accumbens shell*. No entanto, houve aumento de DrD2 no *caudado putâmen*, núcleo *accumbens core* e na ATV (Kindlundh et al., 2001). Assim como foi visto em nossos resultados, os níveis de dopamina podem se apresentar em concentrações diferentes de acordo com a região que é avaliada.

Além dos resultados encontrados na via dopaminérgica, decidimos explorar outras vias pelas quais a oxandrolona poderia interferir no comportamento semelhante ao ansioso, em especial as vias de contraposição ao estresse oxidativo (antioxidantes), e a inflamação, uma vez que outros estudos demonstraram relação entre eles.

Nesse sentido, em nosso estudo, foi encontrado um aumento da enzima CAT no grupo DT no hipocampo, não sendo encontradas diferenças nas regiões da amígdala e CPF, nas doses estudadas. Na literatura é relatado um aumento de EROs e de enzimas antioxidantes decorrentes do uso de EAAs. No estudo realizado por Arazi, Mohammadjafari e Asadi (2017), voluntários usuários de EAAs de forma regular, apresentam aumento de marcadores de estresse oxidativo 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), malondialdeído (MDA), e enzima antioxidativa Glutathione Peroxidase (GPx) em relação aos voluntários que nunca fizeram uso dessas substâncias, caracterizando que os efeitos adversos do uso prolongado de EAA fornecem um estresse oxidativo sustentado, o que conseqüentemente pode levar ao aumento de enzimas antioxidativas como mecanismo protetor desse sistema (Arazi, Mohammadjafari e Asadi, 2017).

Além dos estudos sobre EAA induzindo estresse oxidativo, há estudos que relatam uma relação entre as desordens psicológicas com o aumento das espécies reativas ao oxigênio (Steenkamp et al., 2017). Nesse contexto, o mecanismo protetor das enzimas antioxidantes poderiam reduzir o estresse oxidativo e conseqüentemente impedir os efeitos comportamentais induzidos pelos EAAs. De fato, na presença do estresse oxidativo, a característica lipídica do cérebro favorece a peroxidação, resultando em danos celulares e alterações neurofuncionais e de neurotransmissão. Bouayed et al. (2009), analisou camundongos ansiosos e não ansiosos no teste de claro/escuro e descobriu que a ansiedade é acompanhada por níveis acentuadamente elevados de EROs nas células neuronais e gliais no cerebelo e no hipocampo, assim como nos neurônios do córtex cerebral (Bouayed et al., 2009). Interessantemente, Holmes et al (2013) sugere que os EAA podem ser neuroprotetores antes da ocorrência do estresse oxidativo, porém, são neurotóxicos na presença do estresse oxidativo, como foi observado em estudo realizado com cultura de células, quando essas foram expostas a espécies reativas ao oxigênio havendo um pré-tratamento com T ou DHT enquanto outro grupo apenas recebeu o tratamento após a indução do estresse oxidativo. Assim, foi possível observar que os

andrógenos possuíam capacidade de induzir a morte celular quando o estresse oxidativo já estivesse estabelecido (Holmes et al., 2013).

Estudos demonstram que estresse oxidativo pode causar inflamação devido a interação das EROs com outras moléculas levando a danos celulares envolvendo citocinas inflamatórias como TNF- α . Além do TNF- α , marcadores inflamatórios estão presente em doenças psicológicas como a depressão, que é o caso de um estudo realizado em 2000 por Bottiglieri que demonstra que pacientes afetados pela depressão exibem um aumento significativo de marcadores imunoinflamatórios (Bottiglieri, 2000). Por sua vez, foi demonstrado que a neuroinflamação eleva a produção de EROs e esse estresse oxidativo, por sua vez promove inflamação, formando um loop (Fischer & Maier, 2015).

Dado o fato de que uma das citocinas geralmente envolvida nesses processos é o TNF- α , nosso estudo analisou essa proteína como marcador para a avaliação da inflamação. Nosso estudo não encontrou alteração na análise da expressão de TNF- α tecidual no hipocampo, amígdala ou CPF.

Diferente dos nossos resultados, Maggio (2006), em seu estudo relatou que a reposição de testosterona reduz inflamação em jovens e idosos com hipogonadismo (Maggio, 2006) enquanto resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que os EAAs são capazes de aumentar a produção dessas citocinas inflamatórias quando em abuso, como visto em um estudo de Franquni et al. (2013) que o tratamento com Deca, 20mg/kg/semana durante 4 semanas em ratos Wistar machos, aumentou a quantidade de TNF- α nos grupos tratados (Franquni 2013). Dessa forma, esperava-se que poderia ocorrer aumento desta citocina nos núcleos estudados na dose abusiva de OXA e houvesse uma relação com o comportamento ansioso em nosso estudo, o que não se confirmou.

De fato, a inflamação vem sendo relacionada com o comportamento ansioso em estudos que fornecem fortes evidências de que o TNF- α contribui para o desenvolvimento de ansiedade (Chen et al., 2013). Chen demonstrou aumento de TNF- α na amígdala de camundongos e consequente desenvolvimento de comportamento ansioso avaliado por meio do LCE e CA. Dessa forma, elucidando a relação da inflamação com a ansiedade.

Nesse estudo, podemos observar que os resultados encontrados podem ser mais bem elaborados se o tempo ou a dose de tratamento forem modificados para que sejam cada vez mais próximos do que é encontrado em humanos visto que os dados tendem a ser translacionais. Certamente, mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos envolvidos na alteração do comportamento ansioso observado em ratos jovens, assim como avaliar o comportamento em um período maior de estudo, na medida que os efeitos podem ser exacerbados após uma exposição prolongada desencadeando outras complicações relacionadas ao uso de EAAs.

Dados disponíveis na literatura se apresentam de forma controversa, o que indica que os EAAs podem agir de forma diferente de acordo com o organismo, tecido, tempo e dose estudados. Assim, novos estudos se tornam necessários para que sejam esclarecidas questões relativas a essa classe de fármacos.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a administração de oxandrolona em dose dose semelhante á terapêutica (2,5mg/kg/dia) e em dose supra-terapêutica (37,5mg/kg/dia), por um período de quatro semanas a ratos foi capaz de promover comportamento semelhante ao ansioso. Foram observadas alterações na via antioxidante pelo resultado da alteração da concentração de enzimas desse sistema, e com tendência de aumento do receptor de dopamina no hipocampo, sem participação de citocinas inflamatórias nessas condições estudadas. Pode se concluir que apesar de alguns benefícios citados ao longo do estudo e das importantes funções exercidas no organismo, o uso desse fármaco deve ser feito com cautela e sob orientação médica para que não haja surgimento de efeitos negativos relativos ao uso do fármaco.

7. REFERÊNCIAS

ABRAMOWITZ LK, STICHELEN SO, HANOVER JA. Chromosome Imbalance as a Driver of Sex Disparity in Disease. **Journal of Genomics**, 2:77-88, 2014; 25–46. doi:10.1007/978-0-585-37970-8_2

AKYUREK M, DUNN RM. Oxandrolone. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 118(3):791-4, 2006.

Andersen, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? **Nature Reviews Neuroscience**, 2004; 10(7), S18. <https://doi.org/10.1038/nrn1434>

ANGOORANI H, HALABCHI F. The Misuse of Anabolic-Androgenic Steroids among Iranian Recreational Male Body-Builders and Their Related Psycho-Socio-Demographic factors. **Iran J Public Health**, Vol. 44, No.12, Dec 2015, pp.1662-166.

ARAZI, H., MOHAMMADJAFARI, H., & ASADI, A. Use of anabolic androgenic steroids produces greater oxidative stress responses to resistance exercise in strength-trained men. **Toxicology Reports**, 2017. 4, 282–286 <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.005>

BAHRKE, M. S., YESALIS, C. E., & WRIGHT, J. E. Psychological and Behavioural Effects of Endogenous Testosterone Levels and Anabolic-Androgenic Steroids Among Males. **Sports Medicine**, 1990. 10(5), 303–337. doi:10.2165/00007256-199010050-00003

BASARIA S, WAHLSTROM JT, DOBS AS. Clinical review 138: anabolic androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(11):5108–17.

BELELLI, D., & LAMBERT, J. J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. **Nature Reviews Neuroscience**, 2005;6(7), 565–575. doi:10.1038/nrn1703

BING O, HEILIG M, KAKOULIDIS P, SUNDBLAD C, WIKLUND L, ERIKSSON E. High doses of testosterone increase anticonflict behaviour in rat. **Eur Neuropsychopharmacol** 1998; 8:321–3

BIRGNER, C., KINDLUNDH-HÖGGERG, A. M. S., ORELAND, L., ALSIÖ, J., LINDBLOM, J., SCHIÖTH, H. B., & BERGSTRÖM, L. Reduced activity of monoamine oxidase in the rat brain following repeated nandrolone decanoate administration. **Brain Research**, 2008. 1219, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.014>

BITRAN D, KELLOGG CK, HILVERS RJ. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. **Horm Behav.** 1993; 27:568–83. [PubMed: 8294123]

BITRAN, D., HILVERS, R. J., FRYE, C. A., & ERSKINE, M. S. Chronic anabolic-androgenic steroid treatment affects brain GABAA receptor-gated chloride ion transport. **Life Sciences**, 1996; 58(7), 573–583. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02326-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02326-7)

BORTOLATO M, CHEN K, SHIH JC. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev.** 2008; 60(13-14):1527–1533. doi:10.1016/j.addr.2008.06.002

BOTTIGLIERI T, LAUNDY M, CRELLIN R, TOONE BK, CARNEY MW, REYNOLDS EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2000;69(2):228–232. doi:10.1136/jnnp.69.2.228

BOUAYED J, RAMMAL H, SOULIMANI R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxid Med Cell Longev.** 2009;2(2):63–67.

BROWER, K.J. Anabolic steroid abuse and dependence. **Curr. Psychiatry Rep.**, 2002, 4, 377–387

BUCERZAN, S., MICLEA, D., POPP, R., ALKHZOUZ, C., LAZEA, C., POP, I. V., & GRIGORESCU-SIDO, P. Clinical and genetic characteristics in a group of 45 patients with Turner syndrome (monocentric study). **Therapeutics and clinical risk management**, 13, 613–622, 2017. doi:10.2147/TCRM.S126301

BUTENANDT A; HANISCH G. Über die Umwandlung des Dehydro-androsterons in Δ^4 -Androsten-ol-(17)-0n-(3) (Testosteron); ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin (Vorläuf. Mitteil.). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft** (A and B Series), 68(9), pp.1859–1862, 1935.

CAMPOS, DANIEL ROSSI DE. Detecção de esteroides androgênicos anabólicos por GC/MS em urina de esportistas e alterações séricas bioquímicas e hormonais. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. doi:10.11606/D.9.2004.tde-09082006-131541.

CELOTTI, F.; CESI, P. N. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscle, of their possible mechanisms of action and of their user in athletics. **J. SteroidBiochem Mol Biol**, v. 43, p. 469-477, 1992.

CHAO, T., PORTER, C., HERNDON, D. N., SIOPI, A., IDEKER, H., MLCIAK, R. P. SUMAN, O. E. Propranolol and Oxandrolone Therapy Accelerated Muscle Recovery in Burned Children. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2018. 50(3), 427–435. doi:10.1249/mss.0000000000001459

CHEN, J., SONG, Y., YANG, J., ZHANG, Y., ZHAO, P., ZHU, X. J., & SU, H. CHUAN. The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. **Neuroscience Letters**, 2013, 541, 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.005>

CLARK AS, HENDERSON LP. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 27 :413–436, 2003.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. The biochemical basis of Neuropharmacology (7a ed.), Oxford, Inc., New York, USA, 1996.

COOPER JR, BLOOM FE E ROTH RH. The Biochemical Basis of Neurpharmacology, (8a ed), Oxford, Inc., New York, USA; 2003.

CREUTZBERG EC, WOUTERS EF, MOSTERT R, PLUYMERS RJ, SCHOLS AM. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Chest**, 2003; 124(5): 1733-42.

CUNHA, T.S., CUNHA, N.S., MOURA, M.J.C.S., MARCONDES, F.K. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004

CUNNINGHAM RL, MCGINNIS MY. Factors influencing aggression toward females by male rats exposed to anabolic androgenic steroids during puberty. **Hormones and Behavior** 51:135–141, 2007.

DAVIS, S. M., LAHLOU, N., COX-MARTIN, M., KOWAL, K., ZEITLER, P. S., & ROSS, J. L. Oxandrolone Treatment Results in an Increased Risk of Gonadarche in Prepubertal Boys With Klinefelter Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2018. 103(9), 3449–3455.doi:10.1210/jc.2018-00682

DUCHENNE, G. B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclerosique. **Arch. Gen. Med.** 1868; 11, 5, 178, 305, 421, 552.

EISENBERG, M. E., WALL, M., & NEUMARK-SZTAINER, D. Muscle-enhancing Behaviors Among Adolescent Girls and Boys. **Pediatrics**, 2012. 130(6), 1019–1026.doi:10.1542/peds.2012-0095

FAR HR, ÅGREN G, THIBLIN I. Cardiac hypertrophy in deceased users of anabolic androgenic steroids: an investigation of autopsy findings. **Cardiovasc Pathol.** 2012 Jul-Aug;21(4):312-6. doi: 10.1016/j.carpath.2011.10.002. Epub 2011 Nov 21.

FENICHEL, G. M., GRIGGS, R. C., KISSEL, J., ET AL. A randomized efficacy and safety trial of oxandrolone in the treatment of Duchenne dystrophy. **Neurology** 56: 1075, 2001.

FISCHER, R., & MAIER, O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/610813>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA Approved drug products. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=OXANDROLONE>> Acesso em: 01 de março de 2016.

FRANQUNI, J. V. M., DO NASCIMENTO, A. M., DE LIMA, E. M., BRASIL, G. A., HERINGER, O. A., CASSARO, K. O. D. S., DE ANDRADE, T. U. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids**, 2013. 78(3), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.009>

FRATI P, BUSARDÒ FP, CIPOLLONI L, DE DOMINICIS E, FINESCHI V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. **Current Neuropharmacology**, 2015, 13, 146-159.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 1934; 18(3), 385-403.

HAMMES SR, DAVIS PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 2015;29(4):581–593. doi:10.1016/j.beem.2015.04.001

HAMPL R., BIČÍKOVÁ M., SOSVOROVÁ, L., How Hormones Influence Composition

and Physiological Function of the Brain-Blood Barrier. **Physiol. Res.** 64 (Suppl. 2): S259-S264, 2015

HANDLEY, S. L., & MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 1984; 327(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00504983>

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med**, v. 34, n. 8, p. 513-554, 2004.

HASSAN, W., RONGYIN, G., DAOUD, A., DING, L., WANG, L., LIU, J., & SHANG, J. Reduced Oxidative Stress Contributes to the Lipid Lowering Effects of Isoquercitrin in Free Fatty Acids Induced Hepatocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/313602>

HEBERT A, HAUPT MD, GEORGE D, ROVERE M. Anabolic steroids: a review of the literature. **Am J Sports Med**, v. 12(6), p. 469-84, 1984.

HOFFMAN, E. P., BROWN, R. H., & KUNKEL, L. M. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, 1987; 51(6), 919–928. doi:10.1016/0092-8674(87)90579-4

HOLMES, S., ABBASSI, B., SU, C., SINGH, M., & CUNNINGHAM, R. L. Oxidative stress defines the neuroprotective or neurotoxic properties of androgens in immortalized female rat dopaminergic neuronal cells. **Endocrinology**, 2013; 154(11), 4281–4292. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1242>

HOVATTA, I., TENNANT, R. S., ROBERT A. R. H., SINGER, O., REDWINE, J. M., ELLISON, J. A., SCHADT, E. E., VERMA, I. M., LOCKHART, D.J., BARLOW, C. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. **Nature**, Vol 438|1 December 2005|doi:10.1038/nature04250

JARDÍ, F., LAURENT, M. R., KIM, N., KHALIL, R., DE BUNDEL, D., VAN

EECKHAUT, A. VANDERSCHUEREN, D. Testosterone boosts physical activity in male mice via dopaminergic pathways. **Scientific Reports**, 2018. 8(1). doi:10.1038/s41598-017-19104-0

JOHNSON MD. Anabolic steroid use in adolescent athletes. **Pediatr Clin North Am**. 1990; 37:1111–23. PubMed: 2216557

JUNG, MP, CARDOSO MHCA, VILLAR MAM, LLERENA JR. JC. Revisitando o desvendamento da etiologia da síndrome de Turner. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, 16(2):361-376, 2009.

JUCAITE, A. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. **MEDICINA**, 2002; 38: 357 – 362.

KALININE E, ZIMMER ER, ZENKI KC, KALININE I, KAZLAUCKAS V, HAAS CB, ET AL. Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. **Hormones and behavior**. 2014; 66(2):383–92. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.005> PMID: 24937439

KANAYAMA, G.; POPE, H. G.; HUDSON, J. I. Body image drugs: a growing psychosomatic problem. **Psycho-therPsychosom**, v. 10, p. 61-65, 2001.

KANAYAMA, G., Treatment of Anabolic-Androgenic Steroid Dependence: Emerging Evidence and Its Implications. **Drug and alcohol dependence** 109.1-3 (2010): 6–13. PMC. Web. 30 Dec. 2015.

KARIM, A., RANNEY, R. E., ZAGARELLA, J., & MAIBACH, H. I. Oxandrolone disposition and metabolism in man. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 14(5), 1973. 862–869. doi:10.1002/cpt1973145862

KICMAN AT. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, 154, 502–521, 2008.

KINDLUNDH, A. M. S., LINDBLÖM, J., BERGSTRÖM, L., WIKBERG, J. E. S., &

NYBERG, F. The anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate affects the density of dopamine receptors in the male rat brain. **European Journal of Neuroscience**, 2001; 13(2), 291–296. doi:10.1046/j.0953-816x.2000.01402.x

KÖTTER, R., & MEYER, N. The limbic system: a review of its empirical foundation. **Behavioural Brain Research**, 1992; 52(2), 105–127. doi:10.1016/s01664328(05)80221-9

KROLOW, R., ARCEGO, D. M., NOSCHANG, C., WEIS, S. N., & DALMAZ, C. Oxidative Imbalance and Anxiety Disorders. **Current Neuropharmacology**, 2014. 12(2), 193–204. <https://doi.org/10.2174/1570159x11666131120223530>

KULOGLU, M., ATMACA, M., TEZCAN, E., USTUNDAG, B., & BULUT, S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. **Neuropsychobiology**, 2002. 46(4), 186–189. <https://doi.org/10.1159/000067810>

MAES, M. (n.d.). Major Depression and Activation of The Inflammatory Response System. Cytokines, Stress, and Depression. **Ceska a Slovenska Psychiatrie**, 1999.

MAGGIO, M., BLACKFORD, A., TAUB, D., CARDUCCI, M., BLE, A., METTER, E. J. BASARIA, S. Circulating inflammatory cytokine expression in men with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy. **Journal of Andrology**, 2006; 27(6), 725–728. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000141>

MELCHIOR, C. L., & RITZMANN, R. F. Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 1994; 48(4), 893–897. doi:10.1016/0091-3057(94)90197-x

MENKE, L. A., SAS, T. C. J., DE MUINCK KEIZER-SCHRAMA, S. M. P. F., ZANDWIJKEN, G. R. J., DE RIDDER, M. A. J., ODINK, R. J., WIT, J. M. Efficacy and safety of oxandrolone in growth hormone-treated girls with turner syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2010. 95(3), 1151–1160. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1821>

MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. **Medico-Chirurgical Trans.**, 1852. 35, 73.

MINKIN DM, MEYER ME, VAN HAAREN F. Behavioral effects of long-term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. 1993; 44 (4):959–63. PMID: 8469705

MÖHLER, H. The rise of a new GABA pharmacology. **Neuropharmacol**. 60, 2011, 1042–1049

MONTISCI, M., EL MAZLOUM, R., CECCHETTO, G., TERRANOVA, C., FERRARA, S. D., THIENE, G., & BASSO, C. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: Morphological and toxicological findings in four fatal cases. **Forensic Science International**, 2012; 217(1-3), e13–e18. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.032

MOORADIAN, A. D, MORLEY J. E, KORENMAN S. G. Biological actions of androgens. **Endocr Ver**, v. 8, p.1–28, 1987.

MORROW, A. L., SUZDAK, P. D., & PAUL, S. M. Steroid hormone metabolites potentiate GABA receptor-mediated chloride ion flux with nanomolar potency. **European Journal of Pharmacology**, 1987; 142(3), 483–485. doi:10.1016/0014-2999(87)90094-x

OLIVARES, E. L., SILVEIRA, A. L. B., FONSECA, F. V., SILVA-ALMEIDA, C., CÔRTEZ, R. S., PEREIRA-JUNIOR, P. P. REIS, L. C. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. **Physiology and Behavior**, 2014; 126, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.006>

ONAKOMAIYA MM, PORTER DM, OBERLANDER JG, HENDERSON LP. Sex and Exercise Interact to Alter the Expression of Anabolic Androgenic Steroid-Induced anxiety-Like Behaviors in the Mouse. **Hormones and Behavior**. 66(2): 283– 297,

2014.

PIACENTINO D, KOTZALIDIS GD, DEL CASALE A, AROMATARIO MR, POMARA C, GIRARDI P, SANI G. Anabolic-androgenic Steroid use and Psychopathology in Athletes. A Systematic Review. **Current Neuropharmacology**, 2015, 13, 101- 121.

PRZKORA R, HERNDON DN, SUMAN OE. The effects of oxandrolone and exercise on muscle mass and function in children with severe burns. **Pediatrics**. 2007;119(1):E109-E16. doi: 10.1542/peds.2006-1548. PubMed PMID: WOS:000243191800016

PURVES-TYSON TD, OWENS SJ, DOUBLE KL, DESAI R, HANDELSMAN DJ, WEICKERT CS. Testosterone induces molecular changes in dopamine signaling pathway molecules in the adolescent male rat nigrostriatal pathway. **PLoS One**. 2014; 9(3):e91151. Published 2014 Mar 11. doi:10.1371/journal.pone.0091151

RAINER, Q., SPEZIALI, S., RUBINO, T., DOMINGUEZ-LOPEZ, S., BAMBICO, F. R., GOBBI, G., & PAROLARO, D. Chronic nandrolone decanoate exposure during adolescence affects emotional behavior and monoaminergic neurotransmission in adulthood. **Neuropharmacology**, 2014; 83, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.03.015>

RAMMAL, H., BOUAYED, J., YOUNOS, C., & SOULIMANI, R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(8), 2008. 1156–1159. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.06.005>

RANKE MB. Treatment of children and adolescents with idiopathic short stature. **Nature Reviews Endocrinology**, 9:325–334, 2013.

REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., & AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, 2007. 22(3), 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574lsf>

REEVES, P. T., HERNDON, D. N., TANKSLEY, J. D., JENNINGS, K., KLEIN, G. L.,

MLCAK, R. P., CLAYTON, R. P., CRITES, N. N., HAYS, J. P., ANDERSEN, C., LEE, J., MEYER, W., SUMAN, O. E., FINNERTY, C. C. Five-year outcomes after long-term oxandrolone administration in severely burned children: a randomized clinical trial. **Shock**. 2016 Abril ; 45(4): 367–374. doi:10.1097/SHK.0000000000000517.

ROSS JL, MAZZOCCO MMM, KUSHNER H, KOWAL K, CUTLER JR GB, ROELTGEN D. Effects of Treatment with Oxandrolone for 4 Years on the Frequency of Severe Arithmetic Learning Disability in Girls with Turner Syndrome. 155(5):714-720, 2009.

ROUGÉ-PONT, F., MAYO, W., MARINELLI, M., GINGRAS, M., LE MOAL, M., & PIAZZA, P. V. The neurosteroid allopregnanolone increases dopamine release and dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**, 2002. 16(1), 169–173. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02084.x

RUZICKA, L.;WETTSTEIN, A. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). **Helvetica Chimica Acta**, 18(1), pp.1264–1275. 1935.

SAGOE, D., MOLDE, H., ANDREASSEN, C. S., TORSHEIM, T., & PALLESEN, S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Annals of Epidemiology**, 24(5), 383–398. doi:10.1016/j.annepidem.2014.01.009

SAS TCJ, GAULT EJ, BARDSLEY MZ, MENKE LA, FRERIKS K, PERRY RJ, OTTEN BJ, KEIZER-SCHRAMA SMPFM, TIMMERS H, WIT JM, ROSS JL, DONALDSON MDC. Safety and Efficacy of Oxandrolone in Growth Hormone-Treated Girls with Turner Syndrome: Evidence from Recent Studies and Recommendations for Use. **Hormone research in paediatrics**, 81:289–297, 2014.

SCHWARTZER, J. J., RICCI, L. A., & MELLONI, R. H. Interactions between the

dopaminergic and GABAergic neural systems in the lateral anterior hypothalamus of aggressive AAS-treated hamsters. **Behavioural Brain Research**, 2009; 203(1), 15–22. doi:10.1016/j.bbr.2009.04.007

SELAKOVIC, D., JOKSIMOVIC, J., ZALETEL, I., PUSKAS, N., MATOVIC, M., AND ROSIC, G. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. **PLoS One**, 2017; 12:e0189595. doi: 10.1371/journal.pone.0189595

SHAHIDI, M. D. N. T. A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. **Clinical therapeutics**/vol. 23, no. 9, 2001

SHIRPOOR, A., HESHMATIAN, B., TOFIGHI, A., ELIASABAD, S. N., KHERADMAND, F., & ZEREHPPOOSH, M. Nandrolone administration with or without strenuous exercise increases cardiac fatal genes overexpression, calcium/calmodulin-dependent protein kinase β , and monoamine oxidase activities and enhances blood pressure in adult wistar rats. **Gene**, 2019. 697, 131–137. doi:10.1016/j.gene.2019.02.053

SOLAKOVIC S, TOTIC D, VUKAS H, DJEDOVIC M. Hidden Danger of Irrational Abusing Illegal Androgenic-anabolic Steroids in Recreational Athletes Age Under 35 in Bosnia & Herzegovina. **Med Arh**. 2015 Jun; 69(3): 200-202.

STEENKAMP, L. R., HOUGH, C. M., REUS, V. I., JAIN, F. A., EPEL, E. S., JAMES, S. J., ... LINDQVIST, D. Severity of anxiety– but not depression– is associated with oxidative stress in Major Depressive Disorder. **Journal of Affective Disorders**, 2017; 219, 193–200. doi:10.1016/j.jad.2017.04.042

SULLIVAN ML, MARTINEZ CM, GENNIS P, GALLAGHER EJ. The Cardiac Toxicity of Anabolic Steroids. **Progress in Cardiovascular Diseases** Vol. 41, No. 1 July/August 1998.

TCHELINGERIAN, J.L., QUINONERO, J., BOOSS, C. JACQUE. Localization of TNF alpha and IL-1 alpha immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus, **Neuron** 10 (1993) 213–224

TOBIANSKY DJ, WALLIN-MILLER KG, FLORESCO SB, WOOD RI AND SOMA KK Androgen Regulation of the Mesocorticolimbic System and Executive Function. **Front. Endocrinol**, 2018. 9:279. doi: 10.3389/fendo.2018.00279

TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension. **Hypertension**, 2004. 44(3), 248–252. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000138070.47616.9d>

TUCKER, L. B., & MCCABE, J. T. Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2017. 11.doi:10.3389/fnbeh.2017.00013

TURNER HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. **Endocrinology**, 23(5):566-574, 1938.

TUVDENDORJ E., MD, DAVID L. CHINKES, XIAO-JUN ZHANG, OSCAR E. SUMAN, ASLE AARSLAND, ARNY FERRANDO, GABRIELA A. KULP, MARC G. JESCHKE, ROBERT R. WOLFE, DAVID N. HERNDON,. Long-term oxandrolone treatment increases muscle protein net deposition via improving amino acid utilization in pediatric patients 6 months after burn injury. **Surgery**. 2011;149:645-53.

TZSCHENTKE, T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. **Progress in Neurobiology**, 2001; 63:241-320.

VASHCHINKINA, E., MANNER, A. K., VEKOVISCHEVA, O., HOLLANDER, B., UUSI-OUKARI, M., AITTA-AHO, T., KORPI, E. R. Neurosteroid Agonist at GABAA Receptor Induces Persistent Neuroplasticity in VTA Dopamine Neurons. **Neuropsychopharmacology** (2014) 39, 727–737. 2014

WEBSTER, R.A. Neurotransmitters, drugs and brain function. **John Wiley & Sons: Chichester**, 2001.

WEINBERGER, D. R. Anxiety at the Frontier of Molecular Medicine. **New England Journal of Medicine**, 2001. 344(16), 1247 1249. doi:10.1056/nejm200104193441612

WINTERS S. Androgens: endocrine physiology and pharmacology. **NIDA Res Monographs** 1990;102:113–30.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA) List of Prohibited Substances and Methods. Disponivel em: <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2016-09/wada-publishes-2017-prohibited-list>. Acesso em: 04 de março de 2019.

YELHEKAR TD, DRUZIN M, JOHANSSON S. Contribution of Resting Conductance, GABA_A-Receptor Mediated Miniature Synaptic Currents and Neurosteroid to Chloride Homeostasis in Central Neurons. **eNeuro**. 2017;4(2) doi:10.1523/ENEURO.0019-17.2017

ZOTTI M, TUCCI P, COLAIANNA M, MORGESE MG, MHILLAJ E, SCHIAVONE S, SCACCIANOCE S, CUOMO V, TRABACE L. Chronic nandrolone administration induces dysfunction of the reward pathway in rats. **Steroids** 79:7–13, 2014