

Efeito de doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes androgênicos no cerebelo de camundongos

Effects of supraphysiologic doses of androgenic anabolic steroids in the mice cerebellum

Luana de Souza Gorini¹, Dauanda Kecia Silva², Débora Mantoan Alves²,
Wagner Costa Rossi Junior³, Alessandra Esteves⁴

RESUMO

Introdução. Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são um grupo de compostos naturais e sintéticos formados pelo hormônio testosterona e seus derivados. A finalidade do presente estudo é analisar a densidade de células nervosas do cerebelo de camundongos. **Método.** Os camundongos machos, foram divididos em 4 grupos: G1: Controle (N=10), G2: Deca Durabolin® (N=10), G3: Durateston® (N=10) e G4: tratado com os dois anabolizantes (N=10), simultaneamente. Os camundongos foram tratados durante dois meses, recebendo as doses dos EAA e submetidos à natação três vezes na semana. Após a eutanásia dos animais, os cerebelos foram retirados, fixados e processados histologicamente. Os cortes foram tirados com 7µm e corados com violeta cresil e analisados por um microscópio acoplado a uma câmera e um software de análise para contagem dos corpos de neurônios. **Resultados.** Foram observadas diferenças nos resultados entre os animais do grupo controle (8,41) com os grupos que foram tratados com esteroides Deca Durabolin® (5,10±39%), Durateston® (5,60±33%) e com o grupo tratado com ambos anabolizantes (5,22±38%). **Conclusões.** Desta forma, os resultados obtidos permitem concluir que houve uma diminuição, média dos grupos tratados com EAAs foi de 37%, na densidade de corpos de neurônios no córtex cerebelar.

Unitermos. Esteroides, Anabolizantes, Cerebelo, Neurônios, Camundongos

Citação. Gorini LS, Silva DK, Alves DM, Rossi-Junior WC, Esteves A. Efeito de doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes androgênicos no cerebelo de camundongos.

Trabalho realizado no Laboratório de Estereologia, Morfometria e Morfologia (LEMM) do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, Brasil.

1. Bióloga graduada pela Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.
2. Biomédica, Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.
3. Cirurgião Dentista, Doutor, Docente da Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.
4. Médica Veterinária, Doutora, Docente da Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.

ABSTRACT

Introduction. The androgenic anabolic steroids (AAS) are a group of natural and synthetic compounds formed by the hormone testosterone and its derivatives. The purpose of this study is analyzing the density of nerve cells in the mouse cerebellum. **Method.** The male mice strain were divided into 4 groups: G1: Control (N=10), G2: Deca Durabolin® (N=10), G3: Durateston® (N=10) and G4: They were treated with both anabolic (N=10) simultaneously. Those mice were treated for two months and received doses of AAS and were submitted to swimming three times a week. After euthanasia the animals the cerebellums were removed, fixed and processed histologically. The cut samples were taken with 7µm then stained with cresyl violet and after, analyzed by a microscopic coupled to a camera and analysis software to count the neurons bodies. **Results.** Differences were observed in the results among the control group (8.41) and the groups that were treated with steroid Deca Durabolin® (5.10±39%), Durateston® (5.60±33%), and the group treated with both Anabolic (5.22±38%). **Conclusions.** Thus, it is possible to observe through the results obtained that there was a decrease, the average from treatment groups AAS was 37%, in the density of neuron bodies in the cerebellar cortex.

Keywords. Steroids, Anabolic, Cerebellum, Neurons, Mice

Citation. Gorini LS, Silva DK, Alves DM, Rossi-Junior WC, Esteves A. Effects of supraphysiologic doses of androgenic anabolic steroids in the mice cerebellum.

Endereço para correspondência:

Alessandra Esteves
Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG)
Departamento de Anatomia
R. Gabriel Monteiro da Silva, 700
CEP 37130-000, Alfenas-MG, Brasil
Fone: 35 3299 1302
E-mail: aesteves@unifal-mg.edu.br

Original
Recebido em: 26/06/15
Aceito em: 04/11/15

Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) referem-se aos derivados sintéticos dos hormônios sexuais masculinos que são responsáveis por promover e manter as características sexuais relacionadas à masculinidade¹. O uso é predominantemente associado a atletas profissionais e amadores com a finalidade de obterem ganho muscular e melhor desempenho nos exercícios físicos. A incidência de uso aumentou consideravelmente nos últimos anos e é preocupante o consumo inconsciente por parte de jovens adolescentes, que fazem uso dos EAA devido à importância dada à estética corporal.

Os EAA foram descritos inicialmente pelo fisiologista francês, Charles Edward Brown-Séguard, em 1889. Após a injeção de solução contendo extrato de testículos de animais (cães e suínos), ele relatou a presença de aumento significativo de força e energia mental. Então foram designados ao hormônio testosterona os efeitos anabólicos e/ou androgênicos atuando nos tecidos-alvo específicos. Efeitos anabólicos são responsáveis pelo aumento da síntese de proteínas nos diversos tecidos e músculos. Já os efeitos androgênicos são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas, estimulando o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e das características sexuais secundárias, e auxiliando na manutenção da função reprodutora².

O relato da primeira utilização dos EAA com o objetivo específico de melhorar o desempenho de atletas em competição aconteceu em 1954, durante um campeonato de levantamento de pesos na cidade de Viena, capital da Áustria. Os atletas russos que fizeram uso dos EAA demonstraram performances altamente satisfatórias³.

O consumo ilícito de EAA feito por levantadores de peso e fisiculturistas teve início na década de 50, assim, propagando-se para outras modalidades esportivas. Contudo, segundo o Comitê Olímpico Internacional, devido a razões de ordem ética e aos efeitos nocivos à saúde, essas substâncias tiveram o uso proibido a partir de 1976, onde foi realizado pela primeira vez o controle de anabolizantes, durante a Olimpíada de Montreal⁴.

Mesmo sendo proibido o consumo e declarado ilegal pelos setores governamentais desportivos nacionais e internacionais, os EAA são muito usados por atletas profissionais e amadores, como também por jovens

adolescentes, frequentadores de academias, em todo país. Para adolescentes e jovens adultos, os esteroides levam a um caminho mais curto para conquistar resultados desejados, sendo o porte físico magro e musculoso prioritários⁵.

O consumo dessas substâncias não só cresceu nas últimas décadas como também atingiu outro perfil de usuário, tais como atletas recreacionais e mulheres que utilizam para fins exclusivamente estéticos².

Com finalidade de estudo, ao longo dos anos, as experimentações animais nas pesquisas científicas têm contribuído muito para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de doenças que acometem os seres humanos. Nas últimas décadas, várias espécies de animais têm sido empregadas, sendo os camundongos os mais utilizados e os mais profundamente conhecidos cientificamente. Esta ocorrência deve-se às semelhanças genéticas entre as espécies, sendo que 99% dos genes humanos foram mapeados em camundongos. É importante evidenciar que devido ao seu tamanho pequeno, o camundongo é extremamente vulnerável a mudanças nas condições ambientais. Sendo assim, vale ressaltar que, os camundongos utilizados em experimentações apresentam significativas diferenças fisiológicas⁶.

O cerebelo é um órgão que compõe o sistema nervoso supra segmentar e apresenta um córtex que envolve um centro de substância branca (corpo medular do cerebelo), onde são visualizadas massas de substância cinzenta (núcleos da base do cerebelo). Segundo a visão fisiológica, o cerebelo funciona sempre em nível involuntário e inconsciente, sendo sua função exclusivamente motora⁷. Apesar de não ter capacidade direta de causar contrações musculares, o cerebelo ajuda a organizar em sequência as atividades motoras, monitora e faz regulações corretivas nas atividades motora do organismo à medida que são realizadas, para que sejam executadas conforme os sinais motores enviados pelo córtex motor e também por outras partes do cérebro⁸.

O cerebelo possui em sua porção intermediária o vérmis, que une seus dois hemisférios. Histologicamente este órgão contém três camadas de células, são elas: a camada de células granulares (camada mais interna), a camada de células de Purkinje (camada média), e a camada

molecular (camada mais externa). A camada média é formada por uma fileira de células de Purkinje. Essas células são piriformes e robustas, possuidoras de grandes dendritos que se ramificam na camada molecular e um axônio que chega até os núcleos centrais do cerebelo, onde atuam como inibidores⁷.

As células de Purkinje fazem parte do neocórtex cerebelar, e são elementos dominantes no processo de informação cerebelar, podendo apresentar modificações degenerativas na senescência. Em ratos recém-nascidos que receberam cronicamente álcool por via aérea foi possível perceber que as células-alvo foram as de Purkinje que tiveram uma diminuição em número; depois foram afetadas as células granulares⁹.

Nos últimos anos, conforme detectado em estudos internacionais, o consumo de EAA têm sido abusivo por atletas amadores e adolescentes com fins estéticos, pelo desejo de ganhar peso e melhorar o porte físico, sendo muitas vezes associados ao uso de outras drogas ilícitas para promover agressividade. É particularmente preocupante o aumento da frequência do seu consumo entre esses usuários^{10,11}.

Consequentemente, o uso ilícito dos esteroides anabolizantes vem se tornando um problema de saúde pública, devido o consumo abusivo, muitos efeitos deletérios foram observados, na sua totalidade por disfunções dos vários sistemas fisiológicos¹².

Os EAA também apresentam um alto potencial de produzir efeitos prejudiciais secundários, como perturbações da função hepática, alterações no perfil lipídico, disfunção gonadal e alterações dermatológicas e ainda, pode causar virilização em fêmeas e ginecomastia em machos¹³.

Recentemente, foi confirmado que aproximadamente 100% dos usuários de esteroides anabolizantes expressavam algum efeito colateral. Os mais frequentes são acne, atrofia testicular, agressividade e retenção hídrica. Podendo ressaltar ainda, alterações bioquímicas como dos hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário, enzimas hepáticas, perfil lipídico e alterações na hematopoese¹².

Foi observado uma diminuição na densidade das células de Purkinje de animais machos tratados com Deposteron® quando comparados ao grupo tratado com Winstrol® e também ao grupo controle, o que levou a

sugerir que o efeito no cerebelo depende principalmente da dose utilizada, droga e tempo de exposição da mesma. Além disso, no estudo comportamental de animais expostos ao uso de tais anabolizantes, observaram-se constantes enfrentamentos entre os animais machos. Ao decorrer das semanas de tratamento, a agressividade e irritabilidade se tornaram visivelmente progressiva, aumentando o número de brigas e o número de animais machucados¹⁴.

Considerando as dimensões de consumo de EAA e seus possíveis danos à saúde, o presente estudo pretende buscar o efeito da utilização de doses supra fisiológicas de EAA sobre a densidade de perfis de corpos celulares de neurônios no córtex cerebelar, uma vez que a literatura tem demonstrado que, existe uma diminuição na densidade de neurônios no sistema nervoso central.

MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados neste projeto 40 camundongos machos da linhagem *Swiss*, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas UNIFAL-MG, os quais foram alojados em caixas plásticas, retangulares, medindo 30x18x12cm (comprimento, largura e altura), contendo maravalha trocada a cada 2 dias, sendo que cada caixa continha apenas um animal. Os animais foram tratados com ração comercial e água “ad libitum”, mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro no qual o claro se iniciava às 7 horas.

Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas (no. 496/2012).

Procedimento

Os animais foram divididos em quatro (4) grupos experimentais (n=10), sendo: Grupo I (controle): animais tratados com solução fisiológica uma vez por semana; Grupo II: animais tratados com o anabolizante Deca Durabolin® 16,6mg/kg (uma vez por semana, na quinta-feira); Grupo III: animais tratados com o anabolizante Durateston® 83,3mg/kg (uma vez por semana, na terça-feira); Grupo IV: animais tratados com os dois anabolizantes: Deca Durabolin® 16,6mg/kg e Durateston® 83,3mg/kg, simultaneamente (uma vez por semana cada esteroide, sendo terça-feira, Durateston® e quinta-feira

Deca Durabolin®).

O tratamento consiste na aplicação, no quadrante inferior direito do abdome, via intraperitoneal, de dois tipos diferentes de esteroides anabolizantes, o primeiro, o anabolizante Deca Durabolin® 250mg (propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona) e o segundo, comercializado pelo nome de Durateston® 50mg (decanoato de nandrolona). Os animais foram tratados durante dois meses e as doses aplicadas uma vez por semana. Os animais do grupo controle receberam 0,02mL de solução salina, uma vez por semana, com o objetivo de mimetizar o estresse da aplicação sofrido pelos animais tratados com esteroides.

As doses foram obtidas através de cálculos levando em consideração o uso abusivo de EAA pelos usuários, que corresponde a doses supra fisiológicas variando de 10 a 100 vezes maior que as doses terapêuticas^{15,16} ou até 500 vezes maior¹⁷.

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

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

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados através de inalação do anestésico Halotano® (2-bromo-2-cloro-1,1, 1-trifluoretano)¹⁸ em seguida foi realizada a coleta das amostras com a abertura dos crânios e retirada dos cerebelos, que foram lavados em água corrente e armazenados em paraformaldeído (*Synth*) a 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1M, por 24 horas, com objetivo de manter as características originais do tecido

no momento do óbito, e posteriormente processados para avaliação microscópica.

Os fragmentos dos cerebelos foram processados pela sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool (70%, 80%, 90%, 100%) diafanização em xilol (xilol I e xilol II) e inclusão em parafina (parafina I, parafina II e parafina III). Cada região foi emblocada e cortada com espessura de 7µm em micrótomo Lupe® e coradas com violeta cresil para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitando marcar fortemente e individualmente cada célula para posterior contagem. A espessura do corte possibilita afirmar, que estão sendo quantificadas as células na região analisada. Para os cortes, seguiu a sequência semi seriada, onde se obtinha o primeiro corte e dispensavam os próximos três, totalizando dez cortes de cada cerebelo por lâmina histológica.

Na estimativa da densidade por área dos perfis de corpos celulares de neurônios foi utilizada a metodologia de contagem aleatória simples¹⁹⁻²³. Para isso, foram obtidos três campos microscópicos aleatórios de cinco cortes semi seriados da área, totalizando assim quinze áreas analisadas por animal. Nestas áreas foram sinalizados somente os perfis dos corpos celulares de neurônios que se encontram dispostos dentro da área teste (*counting frame*). Desta forma, aferimos o número de células por área contada, e não o número total dessas células no cerebelo. As lâminas foram codificadas para análise cega, sendo assim, atribuiu-se um código para cada grupo.

Análise Estatística

Para análise quantitativa da densidade dos perfis de corpos celulares de neurônios foi utilizado o teste de variância do programa *GraphPad Prisma 5*, para verificar a presença de interações significantes entre as áreas e os grupos estudados.

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

RESULTADOS

Foram observadas diferenças nos resultados entre os animais do grupo controle (8,41) com os grupos que foram tratados com esteroides Deca Durabolín® (5,10±39%), Durateston® (5,60±33%) e com o grupo tratado com ambos anabolizantes (5,22±38%), mostrando que as alterações nas células de neurônios de Purkinje foram relevantes (Figura 1). A análise da figura mostra que os animais que fizeram o uso dos esteroides Deca Durabolín® e Durateston® e o uso simultâneo dos dois anabolizantes apresentaram menor número de células de Purkinje quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). Entretanto não foram observadas diferenças entre os três grupos que receberam tratamento com esteroides, quando comparados entre si.

DISCUSSÃO

Tal diminuição pode ocorrer devido ao fato de que várias drogas têm claramente efeito tóxico ao cerebelo, tais como fenitoína, lítio e quimioterápicos, causando uma atrofia cerebelar²⁴. Sendo assim esse estudo demonstrou que há alterações quantitativas de corpos de neurônios de Purkinje em decorrência da exposição de anabolizantes em camundongos, correspondendo a uma perda média de 37% no número de corpos de neurônios de Purkinje dos grupos tratados em relação ao grupo con-

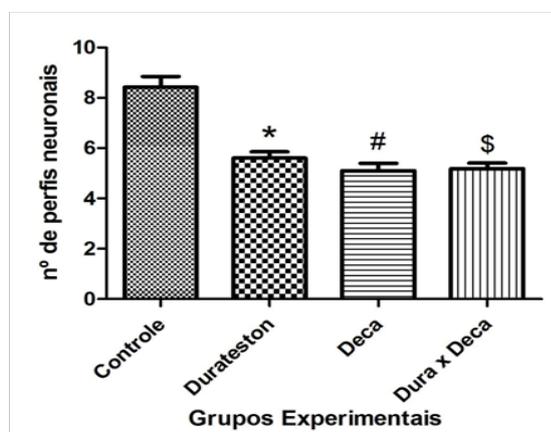


Figura 1. Quantificação total de neurônios de Purkinje nos animais tratados com Deca Durabolín®, Durateston® e a associação destes, mostrando que houve uma redução de corpos celulares neuronais de cerebelos nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Sendo (*) $p < 0,0001$ quando comparados o grupo Durateston® em relação ao grupo Controle; (#) $p < 0,001$ quando comparados grupo Deca-Durabolín® em relação ao grupo Controle e (\$) $p < 0,001$ quando comparados o grupo Dura x Deca em relação ao grupo Controle.

trole.

A maioria dos trabalhos publicados está associada aos prejudiciais efeitos colaterais psicogênicos a superdosagens de anabólicos esteroides incluindo comportamento agressivo e violento e dependência química que os EAA provocam. Nos usuários de tais substâncias também são decorrentes os transtornos psiquiátricos^{25,26}. Os resultados observados por tais autores apontam que não existe relação dos problemas comportamentais e dos transtornos psíquicos com a alteração do número de corpos de neurônios de Purkinje cerebelares, considerando que o cerebelo é um órgão responsável pelas funções motoras e de equilíbrio do organismo.

No estudo realizado em ratos *Wistar*, onde foram submetidos à exposição de ingestão crônica de álcool, foi verificada uma diminuição de células de Purkinje tal qual de células granulares do cerebelo. Certamente a ocorrência de toxicidade ocorre em razão da entrada do etanol no sistema nervoso ser livre, ou seja, não existe limite para a passagem do álcool pela barreira hematoencefálica em consequência à sua alta lipossolubilidade e alto coeficiente de partição óleo-água⁹. Constatando que substâncias lipossolúveis apresentam maior capacidade de passagem, o que ocasiona maior probabilidade de danos cerebelares. Neste caso, os EAA tem menor lipossolubilidade em relação ao etanol, porém houve toxicidade no cerebelo pelo uso dessas substâncias. O consumo de anabolizantes esteroides aumenta as possibilidades de morte neuronal em regiões corticais no cérebro de camundongos²⁷.

As análises obtidas neste recente experimento diferem em alguns aspectos de outro trabalho, onde camundongos foram submetidos ao uso de anabolizantes Potenay® e Deca-Durabolín® durante um mês, e que demonstraram que tais anabolizantes esteroides não levam a variações na densidade de corpos de neurônios de Purkinje no córtex cerebelar, quando comparados ao grupo controle, podendo este tipo de anabolizante não ter atração por neurônios de Purkinje ou mesmo a dose e o tempo de tratamento não ter interferido diretamente no cerebelo¹.

Foi observada uma diminuição na densidade das células de Purkinje de animais machos tratados com Deposteron® quando comparados ao grupo tratado com Winstrol® e também ao grupo controle, o que levou a

sugerir que o efeito no cerebelo depende principalmente da dose utilizada, droga e tempo de exposição da mesma a que corrobora com os dados obtidos neste presente estudo¹⁴.

No estudo realizado sobre efeitos dos EAA Deca Durabolin®, Durateston® e a associação deles, no cortex cerebral e hipocampo de camundongos concluiu-se que esses EAA também provocaram diminuição na quantidade de corpos celulares de neurônios na área límbica, sensitiva e motora do córtex cerebral e nas áreas Ca1 e Ca2 no hipocampo de camundongos. Foi possível ressaltar que o Deca-durabolin® provocou uma redução ainda mais acentuada quando comparado ao Durateston®, que não causou essa redução na área límbica do córtex cerebral e na área Ca2 do hipocampo. Portanto, acredita-se que o uso de Deca-durabolin® é mais prejudicial a essas áreas. Além disso, foi possível afirmar que a associação de dois esteroides, pode causar danos ainda mais severos quando comparado ao uso individual dessas substâncias²⁸.

A partir da literatura sobre o tema fica evidente que existem efeitos neurológicos negativos consideráveis em consequência do uso abusivo ou crônico de esteroides anabolizantes. Sendo assim, estudos com resultados positivos ou negativos sobre alterações neuro-hormonais ou estruturais decorrentes do uso de esteroides anabolizantes, tornam-se essenciais para a melhor compreensão dos efeitos adversos de uma droga em consumo crescente na sociedade²⁴.

CONCLUSÃO

Desta forma, os resultados obtidos permitem observar que houve uma diminuição média dos grupos tratados foi de 37%, na densidade de corpos de neurônios no córtex cerebelar dos camundongos submetidos ao tratamento com os esteroides anabolizantes em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- Silva DK, Esteves A, Rossi Junior WC, Nogueira DA. Quantidade de células de purkinje no cerebelo de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes. *Rev Neurocienc* 2012;20:200-3. <http://dx.doi.org/10.4181/RNC.2012.20.690.4p>
- Fortunato RS, Rosenthal D, Carvalho DP. Abuso de esteroides anabolizantes e seu impacto sobre a função tireóidea. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51:1417-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302007000900003>
- Cunha TS, Cunha NS, Moura MJCS, Marcondes FK. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Rev Bras Cienc Farmaceut* 2004;40:165-79. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000200005>
- Marques MAS, Pereira HMG, Neto FRA. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Rev Bras Med Esp* 2003;9:15-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922003000100004>
- Wood RI. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:490-506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.12.002>
- Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Cienc Farm Basica Apl* 2007;28:11-23.
- Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006, p.363.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.1067.
- Apfel MIR, Ésberard CA, Rodrigues FKP, Bahamad-Júnior FM, Sillero RO. Estudo estereológico das células de purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos wistar. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:258-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2002000200014>
- Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros HMT. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Rev Assoc Med Bras* 1999;45:364-70. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301999000400014>
- Carmo EC, Bueno-Junior CR, Fernandes T, Barretti D, Soares SF, Silva-Junior ND, et al. O Papel do Esteróide Anabolizante Sobre a Hipertrofia e Força Muscular em Treinamentos de Resistência Aeróbia e de Força. *Rev Bras Med Esporte* 2011;17:212-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922011000300013>
- Venâncio PD, Nóbrega ACL, Tufik S, Mello MT. Avaliação Descritiva sobre o Uso de Esteróides Anabolizantes e seu Efeito sobre as Variáveis Bioquímicas e Neuroendócrinas em Indivíduos que Praticam Exercício Resistido. *Rev Bras Med Esporte* 2010;16:191-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922010000300007>
- Urhausen A, Torsten A, Wilfried K. Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic-androgenic-steroid abusers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:369-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00105-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00105-5)
- Ribeiro CM, Silva DK, Damião B, Alves DM, Freitas AC, Rossi-Junior WC, et al. Análise quantitativa de células de Purkinje em camundongos sob o uso dos esteroides anabolizantes. *Rev Neurocienc* 2014;22:432-7. <http://dx.doi.org/10.4181/RNC.2014.22.03.969.6p>
- Brower KJ. Anabolic steroids. *Psychiatr Clin North Am* 1993;16:97-103.
- Clarck AS, Fast AS. Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolonedecanoate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav Neurosci* 1996;110:1478-86. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.110.6.1478>
- Ambar G. Efeitos da administração prolongada do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona em comportamentos emocionais e na expressão de genes relacionados ao sistema serotoninérgico em diferentes áreas cerebrais de camundongos (Dissertação). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008, 80p.
- Métodos de Eutanásia Recomendados Pelo CFMV (Endereço na internet). Rio de Janeiro: Conselho Federal de Medicina Veterinária (Atualizado em out/2014; acessado em jun/2015). Disponível em: <http://www.cesed.br/portal/documentos/ceua/protocolos/MetodosEutanasia.pdf>
- West MJ. New stereological method of counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993;14:275-85.
- West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging* 1993;14:287-93. [http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90113-P](http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580(93)90113-P)
- Mandarim-de-Lacerda CA. *Manual de quantificação Morfológica: Morfo-*

- metria, Alometria e Estereologia. 2a. ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994, p.97.
22. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Solutions to old problems in the quantitation of the central nervous system. *J Neurol Sci* 1995;129:65-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00067-C](http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(95)00067-C)
23. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003;75:469-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>
24. Pedroso JL. Esteroides Anabolizantes e o Sistema Nervoso. *Rev Neurocienc* 2012;20:181-2.
25. Corrigan B. Anabolic steroids and the mind. *Med J Aust* 1996;165:222-6.
26. Cunningham RL. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience* 2007;150:609-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.038>
27. Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. *Brain Res* 2007;24:21-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.047>
28. Silva DK. Análise estereológica do córtex cerebral e do hipocampo de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes (Dissertação). Alfenas: Universidade Federal de Alfenas, 2014, 57p.