

GUILHERME AMBAR

**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 apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psiquiatria

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

SÃO PAULO

2008

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
respeito, apoio e compreensão incondicionais.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”
Aristóteles

Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio recebido durante a realização deste projeto, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro destinado ao presente trabalho.

Ao Dr. José Eduardo Krieger pela disponibilização de toda infraestrutura do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular onde foi realizado o presente estudo.

À Dra. Hiro Goto pelo empréstimo da sala localizada no Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina, onde está localizado nosso Biotério.

Aos companheiros de trabalho do INCOR, especialmente aos auxiliares técnicos Arruda e Jâno por toda a ajuda.

Aos amigos José, Ângelo e Dani por todas as discussões, companheirismo, ajuda, ensinamentos e apoio nos momentos difíceis.

À amiga Marcela Bermudes por todo o conhecimento passado, pela alegria e risadas proporcionadas em todos os momentos, muito boa sorte em sua nova empreitada.

Aos amigos de hoje e sempre, que estiveram do meu lado em todos os momentos, bons e especialmente nos ruins, sempre que precisei, fosse para ficar em casa fazendo nada, Pedrão, Feto, Pexe, Sula, Fefê, Marquito, Fafá, Flatú, muitíssimo obrigado.

Aos amigos de longe, mesmo que nos vendo apenas uma vez ao mês (quando muito), momentos em que renovava todas as energias para seguir em frente, Passa, Tio Chico, Robertinha, Bel, Simão, Jólia, Gabi, Alonso, Marina Japa, Batman, Picles, Daniel, Jaspion, vocês são mais especiais do que imaginam.

À minha namorada Laura por todo amor e companheirismo. À sua família pelo suporte e acolhimento nesse final de jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, pela compreensão, paciência e perseverança em todos esses anos, mesmo após inúmeros tropeços de minha parte, além de todo o conhecimento e discussões importantíssimas no decorrer deste trabalho.

E em especial aos meu pais e meu irmão, pelo apoio incondicional, paciência, puxões de orelha, palavras de incentivo, e por fornecerem toda a estrutura, física e emocional, que permitiram que eu chegasse onde cheguei.

Sumário	
Agradecimentos	4
Sumário	6
Resumo	8
Summary	9
Introdução	10
1- Esteróides anabolizantes	10
2- Esteróides anabolizantes e comportamentos emocionais	16
3- Sistema serotoninérgico central e comportamentos emocionais	19
3.1- Receptores de serotonina	20
4- Esteróides anabolizantes e o sistema serotoninérgico	26
Objetivos	27
Métodos	28
1- Animais	28
2- Drogas	28
3- Delineamento experimental	28
4- Aparatos e modelos comportamentais	30
5- Preparação das amostras para PCR em Tempo Real	33
6- Determinação da concentração hormonal androgênica plasmática	37
Análise dos Resultados	38
Resultados	38
1- Aspectos Fisiológicos e Comportamentais	39
1.1- Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento	39
1.2- Atividade motora espontânea no campo aberto	40
1.3- Comportamento no larinto em cruz elevado	41
1.4- Atividade na caixa claro-escuro	42
1.5- Imobilidade no teste de nado forçado (Porsolt)	43
1.6- Comportamento agressivo (Residente-Intruso)	44
2- Análise da Expressão Gênica Diferencial	44
2.1- Pares de <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes	45
2.2- Genes de referência utilizados em cada estrutura encefálica	45

2.3- Expressão gênica no córtex pré-frontal	46
2.4- Expressão gênica no hipotálamo	48
2.5- Expressão gênica no hipocampo	49
2.6- Expressão gênica na amígdala	51
2.7- Expressão gênica no mesencéfalo	52
3- Determinação da concentração de compostos androgênicos plasmáticos	54
Discussão	56
1- Comportamentos emocionais	57
2- Expressão dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico	60
2.1- Amígdala	60
2.2- Córtex pré-frontal	62
2.3- Hipocampo e Hipotálamo	63
2.4- Mesencéfalo	64
Conclusão	65
Anexo I – Parecer Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa	66
Referências bibliográficas	68

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)*. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP; 2008.

O decanoato de nandrolona é um esteróide anabólico-androgênico (EAA), derivado da testosterona, utilizado de maneira abusiva por indivíduos procurando ganho de força física ou apenas efeitos estéticos. Doses supra-fisiológicas desses compostos têm sido associadas a efeitos psiquiátricos adversos, especialmente episódios de impulsividade e aumento no comportamento agressivo. Considerando o desconhecimento dos mecanismos neurais envolvidos nessa desinibição comportamental, nós investigamos a integridade da transcrição de componentes do sistema serotoninérgico (intimamente relacionados à expressão de comportamentos emocionais) em diversas áreas cerebrais de camundongos sob a administração prolongada de nandrolona. Camundongos machos adultos da linhagem C57Bl/6J receberam uma injeção subcutânea diária de 15 mg/kg de decanoato de nandrolona durante 28 dias. Diferentes grupos de animais foram utilizados para a análise de comportamentos emocionais e para a quantificação da expressão de genes relacionados à serotonina (5-HT), utilizando a transcrição reversa do RNA associada à técnica de PCR em tempo-real. Os camundongos tratados apresentaram um aumento na massa corporal, hiperatividade motora e aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em ambientes novos. A imobilidade avaliada no teste de nado forçado apresentou-se reduzida. Os animais que receberam a nandrolona se mostraram mais agressivos e impulsivos para iniciar o ataque aos camundongos oponentes, no modelo de residente-intruso. O EAA induziu uma redução significativa na quantidade de transcritos da maioria dos receptores pós-sinápticos de 5-HT investigados na amígdala e no córtex pré-frontal. A expressão do gene do receptor 5-HT_{1B} (reconhecidamente envolvido com as alterações comportamentais observadas) estava também reduzida no hipocampo e hipotálamo. No mesencéfalo, região onde se encontram os corpos neuronais dos neurônios serotoninérgicos que inervam o sistema límbico e demais áreas cerebrais, não se observou nenhuma alteração na expressão dos genes relacionados aos receptores serotoninérgicos pré-sinápticos. Os transcritos do transportador e da enzima de síntese de 5-HT, indicadores da integridade serotoninérgica pré-sináptica, também não se apresentaram alterados. Dessa maneira, concluímos que o efeito de altas doses do EAA decanoato de nandrolona em camundongos confirma os dados encontrados em literatura quanto à desinibição comportamental observada em usuários abusivos humanos. Nosso modelo também foi eficiente em mostrar pela primeira vez alterações moleculares induzidas por este EAA. A redução generalizada na expressão dos genes de receptores de 5-HT na amígdala e córtex pré-frontal sugere essas áreas, pós-sinápticas ao sistema serotoninérgico, como críticas nos efeitos induzidos pelo EAA. Nosso trabalho também sugere um papel importante para o receptor 5-HT_{1B} na desinibição comportamental observada.

Palavras-chave: decanoato de nandrolona; agressividade; expressão gênica; sistema serotoninérgico.

Ambar G. *Effects of prolonged administration of the anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate in emotional behaviors and serotonergic system related genes expression in several brain areas of mice (dissertation)*. Medicine Faculty, Sao Paulo University, SP (Brazil); 2008.

Nandrolone decanoate is a highly abused anabolic-androgenic steroid (AAS) by individuals looking for gains in physical strength or body appearance. Supraphysiological doses of this testosterone synthetic derivative have been associated with many physical and psychiatric adverse effects, especially reported episodes of impulsiveness and overt aggressive behavior. Since the neural mechanisms underlying AAS-induced behavioral disinhibition are unknown, we investigated the integrity of serotonergic system transcription in several brain areas of mice under prolonged nandrolone administration. Male C57Bl/6J mice received 15 mg/kg of nandrolone decanoate subcutaneously once daily for 28 days, and different sets of animals were used to investigate motor and emotion-related behaviors or 5-HT-related gene expression by qRT-PCR. AAS-injected mice had increased body weight, were hyperactive and displayed more anxious-like behaviors in novel environments. They exhibited reduced immobility in the forced swim test, higher probability of being aggressive and elevated impulsivity to attack the opponent. AAS induced substantial reduction in the transcription of most postsynaptic 5-HT receptors investigated in the amygdala and prefrontal cortex. Interestingly, 5-HT1B mRNA was further reduced in the hippocampus and hypothalamus. At the midbrain level, there was no alteration in 5-HT receptors, transporter or synthetic enzyme gene transcription. In conclusion, high doses of AAS nandrolone in male mice recapitulate the behavioral disinhibition observed in abusers. Furthermore, they are associated with overall decrease in 5-HT receptor gene expression in the amygdala and prefrontal cortex, implicating these areas as critical sites for AAS-induced effects and indicating a role for the 5-HT1B receptor in this behavioral disinhibition.

Keywords: nandrolone decanoate; aggression; gene expression; serotonergic system.

Introdução

1- Esteróides anabolizantes

Os hormônios esteróides são produzidos pelo córtex da supra-renal e pelas gônadas (ovário e testículo). Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólico-androgênicos (EAA) referem-se aos hormônios esteróides da classe dos hormônios sexuais masculinos, promotores e mantenedores das características sexuais específicas (incluindo o trato genital, as características sexuais secundárias e a fertilidade) e da condição anabólica dos tecidos somáticos (Mooradian *et al.*, 1987). Os EAA incluem a testosterona e seus derivados. Naturalmente no organismo, a testosterona passa por uma série de biotransformações por oxiredução (**Figura 1**). O primeiro passo é a redução nos produtos 5α - e 5β -dihidrotestosterona (DHT), respectivamente pelas enzimas 5α - (cérebro e trato reprodutivo) e 5β -redutases (fígado). Enquanto os esteróides 5α são androgênicos, os 5β não são (Shahidi, 2001).

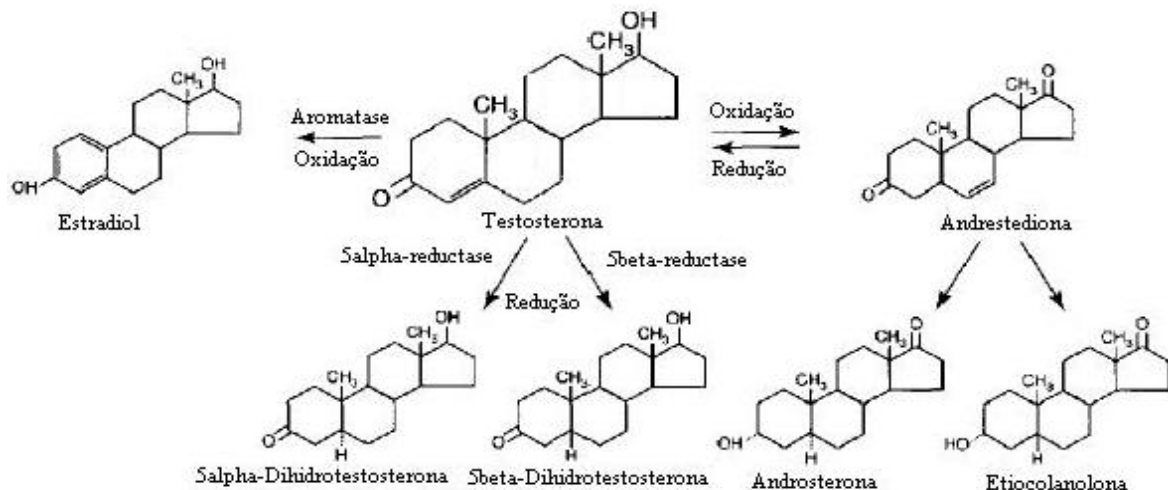


Figura 1. Biotransformação da testosterona.

Atualmente, os EAA têm sido administrados no tratamento das deficiências androgênicas, tais como: hipogonadismo, puberdade e crescimento retardados, micropênis neonatal, deficiência parcial em homens idosos e deficiência secundária por doenças crônicas, contracepção hormonal masculina, osteoporose, anemia secundária, baixa estatura devido à síndrome de *Turner* (Coward, 1989; Rosenfeld *et al*, 1992; Schroor *et al*, 1995; Bhasin *et al*, 1997; De Rose & Nóbrega, 1999; Conway *et al*, 2000). No tratamento das deficiências anabólicas, têm sido utilizados nas sarcopenias relacionadas ao HIV, à cirrose alcoólica, à doença obstrutiva pulmonar crônica, e em pacientes com queimaduras graves (Grinspoon *et al*, 2000; Dobs, 1999); no tratamento da fadiga em pacientes com doença renal crônica e no retardo da fraqueza na distrofia muscular de Duchenne (Johansen *et al*, 1999; Fenichel *et al*, 2001). Há também relatos recentes do uso de esteróides anabólicos em baixas doses no tratamento de doenças cardiovasculares, tendo efeitos antiaterogênicos e antianginosos (English *et al*, 2000). O valor terapêutico da testosterona levou à síntese de muitos derivados com o intuito de prolongar a atividade biológica da molécula parental *in vivo*, produzir androgênios ativos orais, e desenvolver produtos que sejam menos androgênicos e mais anabólicos

(Shahidi, 2001). A atividade anabólica da testosterona e de seus derivados é primeiramente manifestada na ação miotrófica, que resulta em maior massa e força muscular. Entretanto, os benefícios dos EAA em atletas continuam controversos.

Em 1990, em resposta ao problema de produção e venda ilegal de EAA, o Congresso dos EUA aprovou uma legislação fazendo dos EAA substâncias controladas nível III. Apesar da publicidade adversa, estimativas recentes reportam mais de meio milhão de adolescentes com uso freqüente de EAA nos EUA (<http://www.drugabuse.gov/Infofacts/steroids.html>). Dentre os EAA derivados da testosterona mais consumidos nos EUA (**Tabela 1**), o decanoato de nandrolona é o mais utilizado.

Tabela 1: Lista dos EAA mais consumidos nos EUA (National Institute on Drug Abuse- NIDA), 2001

Esteróides orais	Esteróides injetáveis
<i>Anadrol</i> (oximetolona)	<i>Deca-Durabolin</i> (decanoato de nandrolona)
<i>Oxandrin</i> (oxandrolona)	<i>Durabolin</i> (fenilpropionato de nandrolona)
<i>Dianabol</i> (metandrostenolona)	<i>Depo-testosterone</i> (cipionato de testosterona)
<i>Winstrol</i> (estanozolol)	<i>Equipoise</i> (undecilenato de boldenona)

No Brasil, estudos que abordam o uso de anabolizantes são escassos (Iriart & Andrade, 2002). Entretanto, levantamentos feitos pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), realizados no ano de 2005 nas 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, 0,9% da população (456.000) já utilizou esteróides anabolizantes alguma vez na vida (CEBRID, 2005). O consumidor preferencial no Brasil é representado por homens entre 17 e 34 anos (**Figura 2**). O maior número de usuários concentra-se na região Sudeste do país (**Figura 3**), e o uso, comparado com a última estimativa realizada em 2001, obteve um aumento de 206% (**Figura 4**). Estes números ainda são considerados baixos se comparados às demais

drogas de abuso, entretanto indicam um aumento preocupante no número de usuários dessa substância no Brasil.

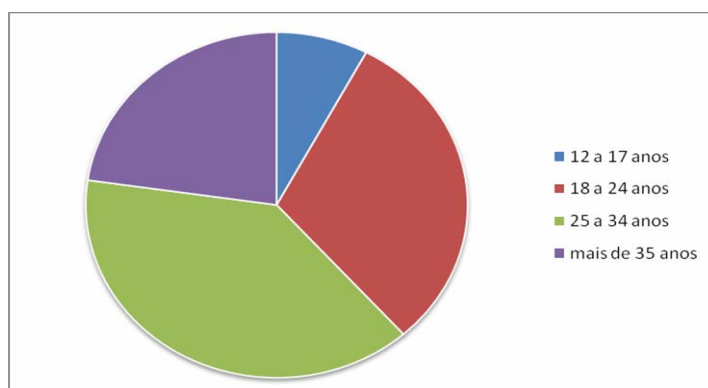


Figura 2. Faixa etária da população brasileira que teria consumido esteróides anabolizantes “ao menos uma vez na vida” segundo estimativas do CEBRID realizadas em 2005 nas 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes.

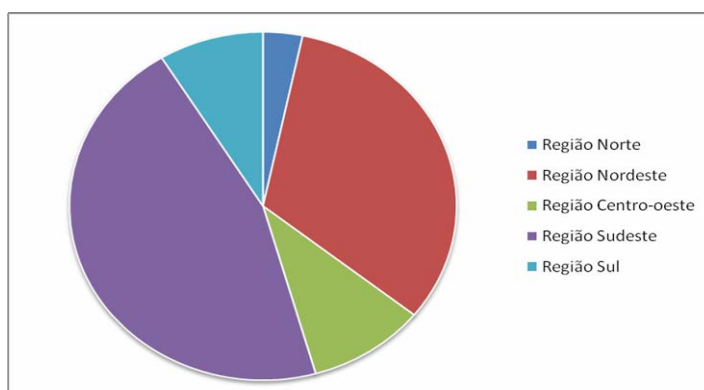


Figura 3. Estimativa da porcentagem da população brasileira que teria usado esteróides anabolizantes “ao menos uma vez na vida” por região geográfica, realizada pelo CEBRID em 2005 levando em conta as 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes.

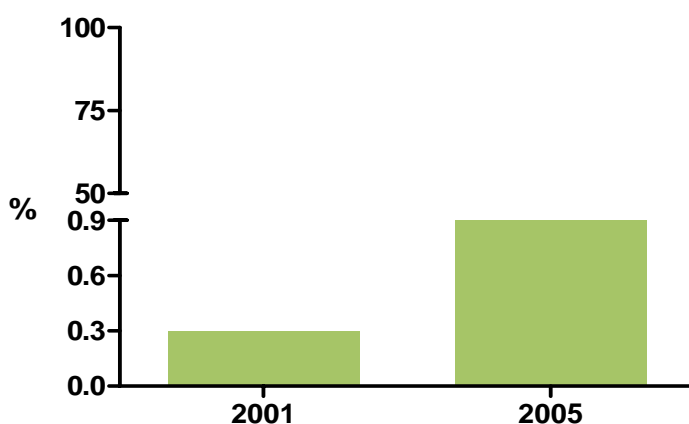


Figura 4. Comparativo entre as estimativas do CEBRID realizadas em 2001 e 2005 quanto a porcentagem da população brasileira que teria usado esteróides anabolizantes “ao menos uma vez na vida”.

Não existem informações sobre os EAA mais utilizados no Brasil, entretanto, é grande o número de compostos encontrados no mercado nacional (**Tabela 2**).

Tabela 2: Lista das substâncias anabolizantes disponíveis atualmente no mercado brasileiro segundo a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Junho de 2008)

Substâncias anabolizantes sujeitas a controle especial

1. ANDROSTANOLONA	15. METANDRANONA
2. BOLASTERONA	16. METANDRIOL
3. BOLDENONA	17. METENOLONA
4. CLOROXOMESTERONA	18. METILTESTOSTERONA
5. CLOSTEBOL	19. MIBOLERONA
6. DEIDROCLORMETILTESTOSTERONA	20. NANDROLONA
7. DROSTANOLONA	21. NORETANDROLONA
8. ESTANOLONA	22. OXANDROLONA
9. ESTANOZOLOL	23. OXIMESTERONA
10. ETILESTRENOL	24. OXIMETOLONA
11. FLUOXIMESTERONA OU FLUOXIMETILTESTOSTERONA	25. PRASTERONA (DEIDROPIANDROSTERONA - DHEA)
12. FORMEBOLONA	26. SOMATROPINA (HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO)
13. MESTEROLONA	27. TESTOSTERONA
14. METANDIENONA	28. TREMBOLONA

O decanoato de nandrolona também possui os derivados 5α , 5β e pode ser aromatizado, porém, é mais anabólico e menos androgênico que a testosterona (Engel *et al*, 1987). Como a própria testosterona, ele pode ser aromatizado em 17β -estradiol, e

assim apresentar um efeito adicional e significativo sobre o sistema nervoso central, agindo sobre os receptores androgênicos na sua forma natural e sobre os estrogênicos através dos metabólitos de sua forma estrogênica (Clark *et al.* 2003).

Os efeitos estimulantes dos andrógenos no cérebro – que freqüentemente resultam em um sentimento de euforia e agressividade crescentes– associados ao resultado muscular, têm proliferado o uso de EAA por atletas de todos os níveis, assim como por usuários de outras drogas de abuso. O uso dos EAA se dá basicamente de três maneiras:

- 1- “ciclo”: que se refere a qualquer período de utilização de tempos em tempos, variando de quatro a dezoito semanas;
- 2- “pirâmide”: pequenas doses que vão aumentando gradualmente até o ápice, e logo em seguida reduzindo gradualmente até o final do período;
- 3- “*stacking*”: (uso alternado de acordo com a toxicidade), que consiste em vários esteróides utilizados ao mesmo tempo.

É comum a mistura dos três métodos, e geralmente os EAA são administrados em doses supra fisiológicas (que caracteriza o uso abusivo), podendo chegar a 500mg ou mais por dia, consumidas por várias semanas ou meses (Wu, 1997; Catlin, 2001).

2- Esteróides anabolizantes e comportamentos emocionais

O uso abusivo de EAA é baseado em doses supra fisiológicas que são de 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas (Brower, 1993; Clark & Fast, 1996), e isso tem sido associado a um amplo espectro de efeitos adversos físicos e psíquicos. Pouco se sabe sobre a atuação dos EAA no cérebro humano, havendo relatos de alterações no

comportamento agressivo, ansiedade e depressão (Pope & Katz, 1988; Bahrke *et al.*, 1990; Schulte *et al.*, 1993).

Uma série de estudos sugere que os esteróides podem causar sintomas hipomaniacos ou maníacos, incluindo particularmente comportamento agressivo ou violento em alguns indivíduos (Pope *et al.*, 1996). Alguns trabalhos clássicos sugerem um aumento no comportamento típico de depressão ou humor disfórico com o uso dos EAA (Lefavi *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1993), sendo esse aumento considerado de severidade insuficiente para ser considerado um transtorno psiquiátrico (Perry *et al.*, 1990). Contudo, outros trabalhos não encontraram relação entre o uso da droga e depressão ou níveis de tensão/ansiedade (Bahrke *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1990). As alterações emocionais não podem ser explicadas apenas pelos efeitos do halterofilismo e pela cultura das academias de ginástica, ou ainda pela personalidade dos usuários, pois estes sintomas não são encontrados nos não usuários com históricos atléticos semelhantes ou nos próprios usuários durante os intervalos em que não estão tomando as drogas (Pope & Katz, 1988; Choi *et al.*, 1990; Lefavi *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1990; Burnett & Kleiman, 1994; Pope & Katz, 1994). O comportamento agressivo é um dos mais afetados pelo abuso de esteróides (Midgley *et al.*, 2001), inclusive podendo levar a crimes violentos (Conacher & Workman, 1989).

Com relação aos mecanismos celulares e moleculares dos hormônios esteróides, vale lembrar que os efeitos obtidos em curto prazo parecem ser devido a modulações alostéricas ou ações pós-traducionais na membrana celular (Clark e col. em 2003). Entretanto, os efeitos que só são evidentes após a administração prolongada dos EAA implicam em alterações na expressão gênica, mediadas pela ação de receptores androgênicos e estrogênicos no cérebro. Os hormônios esteróides atuam em proteínas receptoras intracelulares, e após a ligação do hormônio ao receptor ocorre uma

translocação desse complexo para o núcleo celular e então para sítios de ligação na cromatina, através dos quais modulam a transcrição gênica e subsequente síntese de RNA mensageiro (RNAm). Efeitos diferenciais dos EAA são observados dependendo do local e tipo celular em que estão atuando (Spelsberg *et al.*, 1989).

Estudos recentes estão começando a investigar mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de EAA em roedores. O uso crônico de EAA em camundongos mostrou-se indutor de mudanças dependentes de dose, sexo e idade na expressão gênica da subunidade do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores (McIntyre *et al.*, 2002; reviewed in Clark *et al.*, 2006) sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico. O envolvimento glutamatérgico foi recentemente demonstrado em hamsters adolescentes tratados com EAA pelo aumento nos neurônios que expressam glutamato e na expressão do receptor GluR1 em áreas específicas de agressividade (Fischer *et al.*, 2007).

Roedores recebendo injeções de EAA em doses suprafisiológicas (> 3 mg/kg/day, Clark & Fast, 1986; Clark & Henderson, 2003) mostraram aumento na agressão social (Breuer *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2000), sendo os efeitos freqüentemente dependentes da espécie e linhagem do animal, bem como do tipo de EAA administrado (Clark & Henderson, 2003). Hamsters tratados com decanoato de nandrolona durante seu período de desenvolvimento apresentaram aumento do receptor V_{1A} em estudos de ligação (*estudos de "binding"*) e na densidade de fibras imunorreativas de arginina vasopressina no hipotálamo anterior e em áreas cerebrais relacionadas à agressividade (Harrison *et al.*, 2000; De Leon *et al.*, 2002).

Camundongos tratados com a mesma droga cronicamente apresentaram diminuição na quantidade de RNAm do receptor dopaminérgico D1 nos núcleos caudado-putâmen e núcleo *acumbens* (Kindlundh *et al.*, 2001; Kindlundh *et al.*, 2003), receptor também

implicado à modulação do comportamento agressivo (Volavka *et al*, 2004). Outros estudos tentam correlacionar as alterações comportamentais aos efeitos dos EAA nas neurotransmissões centrais serotoninérgicas, gabaérgicas, entre outras, em diversas áreas do cérebro (Thiblin *et al*, 1999; Hallberg *et al*, 2000; Yang, 2002).

3- Sistema serotoninérgico central e comportamentos emocionais

A serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor abundante no SNC, participando do neurodesenvolvimento e plasticidade sináptica, tanto regulando seu próprio desenvolvimento (os níveis de 5-HT no encéfalo imaturo determinam os níveis de 5-HT no encéfalo adulto, Whitaker-Azmitia *et al.*, 2000) como participando da neurogênese, diferenciação e especialização neuronais e manutenção do fenótipo (Mazer *et al.*, 1997; Lesch, 2001). A neurotransmissão serotoninérgica também é responsável pela modulação da atividade neuronal e liberação de neurotransmissores (Barnes & Sharp, 1999). Anormalidades na função do sistema serotoninérgico são encontradas em pacientes com transtornos de humor e ansiedade, e seu sistema é um alvo primário para drogas que tratam eficazmente esses transtornos (Ballenger, 1999), confirmando uma duradoura hipótese que confere à 5-HT um papel crucial na modulação de estados emocionais (Graeff *et al.*, 1996; Julius, 1998; Mann, 1999; Goodman, 1999; Nelson & Chiavegatto, 2001; Graeff, 2002). Os circuitos neuronais corticolímbicos que medeiam os comportamentos emocionais e estão implicados na patofisiologia de transtornos psiquiátricos como agressividade, ansiedade, depressão, alcoolismo, esquizofrenia, entre outros, são densamente inervados por neurônios serotoninérgicos e exibem uma rica expressão de receptores de 5-HT (Frazer & Hensler, 1994), sugerindo uma participação do sistema nesses fenótipos.

3.1- Receptores de serotonina

No cérebro de mamíferos foram clonados até agora 14 genes codificadores de receptores de 5-HT, divididos em 7 classes (5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4, 5HT5, 5HT6 e 5HT7), e nem todos possuem funções conhecidas (Hoyer et al. 2002).

Os receptores serotoninérgicos relacionados aos transtornos emocionais são muito estudados devido a sua importância como alvo terapêutico de muitos fármacos, dentre esses, os receptores 5-HT_{1A} são reconhecidamente associados aos comportamentos emocionais e encontram-se em maior densidade nas áreas límbicas (Lanfumey & Hamon, 2004). Os receptores 5-HT_{1A} do tipo auto-receptores estão localizados pré-sinápticamente na região somato-dendrítica dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos dorsal e medial da rafe, e controlam a síntese e liberação da 5-HT na fenda sináptica. Os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, são heteroreceptores encontrados mais densamente em neurônios de regiões corticais e límbicas, como o córtex frontal, núcleo septal, hipocampo e amígdala (Olivier *et al.*, 1999; Riad *et al.*, 2000), mas também estão presentes no hipotálamo onde desempenham um importante papel na regulação da função neuroendócrina e da resposta ao estresse, associado ao eixo límbico-hipotalâmico-pituitária-adrenal (Van de Kar, 1991; Morley-Fletcher *et al.*, 2004). Agonistas do receptor 5-HT_{1A} possuem propriedades ansiolíticas na clínica e em modelos animais (Feighner & Boyer, 1989; Menard & Treit, 1999). Camundongos com ausência do receptor 5-HT_{1A} (*knockout* ou 5-HT_{1A}^{-/-}) mostraram um perfil ansiogênico concordante com o papel do receptor 5-HT_{1A} na ansiedade revelado por estudos farmacológicos anteriores (Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Heisler *et al.*, 1998).

Os auto-receptores 5-HT_{1B} não são expressos no corpo celular dos neurônios serotoninérgicos, mas sim nas terminações desses neurônios localizados no córtex cingulado, entorinal, no hipocampo, estriado, núcleo subtalâmico, núcleos da rafe,

células de *Purkinje* e medula espinhal (Trouillas, 1984; Pazos & Palacios, 1985; Marlier *et al.*, 1991; Doucet *et al.*, 1995; Bonasera & Tecott, 2000). Também estão presentes nas terminações de outros neurônios (heteroreceptores), como os dopaminérgicos, gabaérgicos e glutamatérgicos, onde agem como inibidores da liberação dos respectivos neurotransmissores (Sari *et al.*, 1997; Riad *et al.*, 2000).

Estudos genéticos e farmacológicos sugerem um papel para o receptor 5-HT_{1B} em personalidade anti-social, alcoolismo (Lappalainen *et al.*, 1998), e aumento na vulnerabilidade ao abuso de drogas (Gingrich & Hen, 2001). O estudo de animais geneticamente modificados, os mutantes nulos para o gene do receptor 5-HT_{1B} (5-HT_{1B}^{-/-}), demonstrou um alto grau de agressividade nestes animais, sugerindo o envolvimento deste receptor na modulação do comportamento agressivo (Ramboz *et al.*, 1996; Gingrich & Hen, 2001). Agonistas 5-HT_{1B} reduzem a agressividade em roedores, sendo este efeito anti-agressivo mais seletivo do que o efeito obtido pelos agonistas 5-HT_{1A}, que parecem reduzir também o comportamento locomotor e exploratório (Chiavegatto *et al.*, 2001; Nelson & Chiavegatto, 2001; deAlmeida & Miczek, 2002; Olivier, 2004; Miczek *et al.*, 2004).

Os receptores 5-HT_{2A} são particularmente abundantes no córtex pré-frontal (Cornea-Hebert *et al.*, 2002; Miner *et al.*, 2003) e tem sido relacionados à discinesia tardia, agressividade, depressão severa, suicídio, transtorno obsessivo-compulsivo e prejuízos cognitivos em transtornos como esquizofrenia e depressão (Kroeze & Roth, 1998; de Angelis, 2002). São reconhecidamente sítios de ação de alucinógenos como o ácido lisérgico (LSD) (Aghajanian & Marek, 1999), e alvos de alguns antipsicóticos atípicos (Adell *et al.*, 2005).

A ativação dos receptores 5-HT_{2C} está relacionada à inibição de neurônios dopaminérgicos, o que pode ser relevante para o tratamento da depressão e dos sintomas

negativos da esquizofrenia, utilizando anti-psicóticos atípicos que se aproveitam dessa característica (Gobert *et al.* 2000; Berg *et al.* 2005; Ji *et al.* 2006). Antes da geração dos camundongos “*knockout*” para o gene desse receptor, estudos com agonistas não seletivos o associaram ao comportamento alimentar e à ansiedade (revisado em Barnes & Sharp, 1999), o que foi comprovado constatando-se aumento de 25-30% na ingestão de alimentos e desenvolvimento de obesidade por volta de 5-6 meses nestes animais geneticamente modificados (Tecott *et al.*, 1995; Nonogaki *et al.*, 1998).

Os receptores 5-HT₃ pertencem à classe de receptores serotoninérgicos de canal iônico, diferentemente dos outros que são metabotrópicos, e parecem estar relacionados com cognição, êmese, dor crônica, redução do consumo de álcool entre outros (Barnes & Sharp, 1999; Wolf, 2000). Estudos clínicos utilizando antagonistas específicos para essa classe de receptores demonstraram ser eficazes no tratamento de distúrbios de ansiedade generalizada e síndrome do pânico (Schneier *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1997). Estudos comportamentais posteriores, utilizando camundongos com deleção para o gene da subunidade 3A, demonstraram fenótipo ansiolítico em todos os testes empregados, o que evidencia a importância dessa subunidade nesse tipo de transtorno (Kelley *et al.*, 2003).

O receptor 5-HT₆ é quase que exclusivamente expresso no sistema nervoso central, onde é encontrado abundantemente em regiões límbicas e corticais (Wooley *et al.*, 2004). Estudos farmacológicos e de localização em ratos sugerem sua possível participação na modulação de processos cognitivos (Rogers & Hagan, 2001), em transtornos psicóticos e afetivos, ansiedade, epilepsia e na retenção de memória, mas não no consumo de alimentos (Wooley *et al.*, 2004), além de participação na neurotransmissão colinérgica (Bourson *et al.*, 1998).

O receptor 5-HT₇ é principalmente encontrado no tálamo, hipotálamo, córtex

frontal, hipocampo e amígdala (Hedlund & Sutcliffe, 2004; Thomas & Hagan, 2004). Estudos funcionais relacionam esse receptor ao processo de termoregulação e sono REM, via modulação dos neurônios do núcleo supraquiasmático. Nesse sentido, seus antagonistas inibem o sono REM e aumentam a latência para o começo do mesmo. Camundongos mutantes nulos para esse receptor apresentam uma diminuição da plasticidade sináptica da região CA1 hipocampal e do condicionamento contextual ao medo, sugerindo seu papel nos processos de memória e aprendizado (Thomas & Hagan, 2004).

A enzima de biossíntese da 5-HT e que atua como passo limitante da reação é a triptofano hidroxilase (TPH). Esta possui duas subunidades, TPH1 e TPH2, sendo a TPH2 detectada exclusivamente no cérebro e nos neurônios do plexo mioentérico e a TPH1 em órgãos periféricos. Estudos de expressão em ratos e humanos revelaram que o RNAm da TPH2 é predominantemente expresso no núcleo da rafe, e em maior quantidade do que o TPH1 (Côté *et al.*, 2003; Walther & Bader, 2003; Walther *et al.*, 2003; Zill *et al.*, 2007). Polimorfismos funcionais de base única no gene que expressa TPH2 foram relacionados à redução da concentração de 5-HT no SNC de murinos (Zhang *et al.*, 2004), e associados a casos clínicos de depressão e suicídio (confirmados por estudos de haplótipos, Harvey *et al.*, 2004; Zill *et al.* 2004a; Zill *et al.*, 2004b), autismo (Coon *et al.*, 2005), sintomas negativos em pacientes masculinos esquizofrênicos (Shinkai *et al.*, 2000), agressão impulsiva em pacientes com distúrbios de personalidade (Nolan *et al.*, 2000).

A proteína transportadora de 5-HT (5-HTT) atua como um mecanismo regulador chave na neurotransmissão serotoninérgica, responsável pela recaptura da 5-HT após sua liberação na fenda sináptica (Lesch & Mossner, 1998). Desta forma, a 5-HTT representa um importante alvo terapêutico para o tratamento de inúmeras

psicopatologias. Contrariando as expectativas, camundongos 5-HTT^{-/-} mostraram-se viáveis e sem quaisquer alterações visíveis no desenvolvimento ou na taxa de mortalidade (Bengel *et al.*, 1998), apesar de uma marcante elevação do nível de 5-HT extracelular em regiões como o hipocampo e córtex frontal (Mathews, *et al.* 2004).

Estudos em humanos analisando a prevalência de formas variantes do gene codificante da proteína 5-HTT em algumas famílias mostraram sua relação com ansiedade, reatividade ao estresse e depressão (Greenberg, *et al.* 2000).

Estudos utilizando os animais *knockouts* para o gene 5-HTT apontaram também um aumento em comportamentos relacionados à ansiedade (Holmes, 2001) e depressão, diminuição na agressividade nos camundongos machos (Holmes *et al.*, 2002; Lira *et al.*, 2003) e um aumento da reatividade ao estresse com elevação plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Li *et al.*, 1999). Polimorfismos nesse gene em humanos sugerem sua associação com medo, ansiedade (Hariri *et al.*, 2002), depressão, agressividade (Bennett *et al.*, 2002) e comportamento suicida (Du *et al.*, 2001).

Tabela 3: Principais componentes do sistema serotoninérgico, localização encefálica e principais implicações em comportamentais emocionais.

<i>Neurotransmissores/Enzimas do sistema serotoninérgico</i>	<i>Localização encefálica mais abundante</i>	<i>Principais comportamentos emocionais relacionados</i>	<i>Bibliografia relacionada</i>
5-HT _{1A}	Áreas corticais e límbicas	Ansiedade, agressividade, resposta ao estresse	Heisler <i>et al.</i> , 1998; Parks <i>et al.</i> , 1998; Ramboz <i>et al.</i> , 1998; Menard & Treit, 1999; Olivier <i>et al.</i> , 1999; Riad <i>et al.</i> , 2000; Morley-Fletcher <i>et al.</i> , 2004
5-HT _{1B}	Córtex cingulado entorinal, hipocampo, estriado, núcleo subtalâmico, núcleos da rafe	Agressividade, vulnerabilidade ao abuso de drogas	Doucet <i>et al.</i> , 1995; Lappalainen <i>et al.</i> , 1998; Bonasera & Tecott, 2000; Riad <i>et al.</i> , 2000; Chiavegatto <i>et al.</i> , 2001; Gingrich & Hen, 2001; Nelson & Chiavegatto, 2001; deAlmeida &

			Miczek, 2002; Olivier, 2004; Miczek <i>et al.</i> , 2004
5-HT _{2A}	Córtex pré-frontal	Agressividade, depressão severa, cognição	Kroeze & Roth, 1998; Aghajanian & Marek, 1999; de Angelis, 2002; Cornea-Hebert <i>et al.</i> , 2002; Miner <i>et al.</i> , 2003; Adell <i>et al.</i> , 2005
5-HT _{2C}	Área ventral tegmental	Depressão, ansiedade, comportamento alimentar	Tecott <i>et al.</i> , 1995; Nonogaki <i>et al.</i> , 1998; Barnes & Sharp, 1999; Gobert <i>et al.</i> 2000; Berg <i>et al.</i> 2005; Ji <i>et al.</i> 2006
5-HT _{3A}	Áreas corticais e límbicas	Ansiedade, cognição	Schneier <i>et al.</i> , 1996; Freeman <i>et al.</i> , 1997; Barnes & Sharp, 1999; Wolf, 2000; Kelley <i>et al.</i> , 2003
5-HT ₆	Áreas corticais e límbicas	Ansiedade, cognição, memória	Bourson <i>et al.</i> , 1998; Rogers & Hagan, 2001; Wooley <i>et al.</i> , 2004
5-HT ₇	Tálamo, hipotálamo, córtex frontal, hipocampo e amígdala	Cognição, memória	Hedlund & Sutcliffe, 2004; Thomas & Hagan, 2004
TPH2	Núcleos da rafe	Depressão, agressividade	Nolan <i>et al.</i> , 2000; Côté <i>et al.</i> , 2003; Walther & Bader, 2003; Walther <i>et al.</i> , 2003; Harvey <i>et al.</i> , 2004; Zill <i>et al.</i> 2004a; Zill <i>et al.</i> , 2004b; Zill <i>et al.</i> , 2007
5-HTT	Mesencéfalo	Ansiedade, medo, agressividade, depressão, reatividade ao estresse	Li <i>et al.</i> , 1999; Holmes, 2001; Bennett <i>et al.</i> , 2002; Hariri <i>et al.</i> , 2002; Holmes <i>et al.</i> , 2002; Lira <i>et al.</i> , 2003; Mathews, <i>et al.</i> 2004

Assim, pode-se observar que tanto as pesquisas clínicas, quanto aquelas utilizando modelos animais, identificam uma influência dos EAA em alterações emocionais. Devido ao importante papel da 5-HT na neuromodulação e regulação de um amplo espectro comportamental, uma possível interação dos EAA sobre o sistema serotoninérgico deve ser investigada, visando o melhor entendimento dos mecanismos neuromoleculares que medeiam as alterações de fenótipo associados ao seu uso abusivo.

4- Esteróides anabolizantes e o sistema serotoninérgico

Estudos utilizando o decanoato de nandrolona sugerem uma participação dos EAA na modulação serotoninérgica, levando a uma diminuição na densidade de receptores 5HT_{1B} no hipocampo e aumento na densidade de receptores 5HT₂ no núcleo acumbens (Kindlundh *et al.*, 2001; Kindlundh *et al.*, 2003), receptores estes já relacionados à modulação do comportamento agressivo (Chiavegatto *et al.*, 2001; Nelson & Chiavegatto, 2001; Volavka *et al.*, 2004).

A utilização de hamster sírios reforça a interação entre os EAA e o sistema 5-HT na modulação de comportamentos emocionais, especialmente o comportamento agressivo (Grimmes *et al.*, 2006). Este grupo de pesquisadores mostrou uma diminuição na inervação serotoninérgica e alterações na expressão de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} em áreas cerebrais (Grimes & Melloni, 2002, 2005; Ricci *et al.*, 2006), assim como uma diminuição na imunoreatividade do receptor 5-HT_{1A} comprovada por ensaios quantitativos no hipotálamo anterior (Ricci *et al.*, 2006) nos animais tratados com o EAA.

Os mecanismos neurobiológicos associados ao uso destas substâncias e comportamentos emocionais, dentre eles a agressividade, e em especial sua interação com o sistema serotoninérgico ainda são pouco conhecidos. Considerando o crescente aumento no uso de EAA, inclusive no Brasil, e o risco de comportamentos anti-sociais relacionados, estudos utilizando modelos animais mimetizando o uso abusivo em humanos, associados a modelos comportamentais já bem estabelecidos, podem fornecer importantes informações sobre o mecanismo de atuação dessas drogas no cérebro (revisado em Clark & Henderson, 2003).

Observou-se que os efeitos dos esteróides anabolizantes sobre o comportamento agressivo são extremamente dependentes do tipo de composto utilizado,

regime de uso, dose e meio de administração, assim como variando entre as espécies e linhagens e o paradigma utilizado para a experimentação (revisado de Grimmes *et al.*, 2006).

Para o presente estudo escolhemos camundongos machos adultos (C57Bl/6J), organismos que além de apresentarem alta similaridade genética com humanos, podem ser manipulado geneticamente através de metodologias já bem estabelecidas (Janssen *et al.*, 2005). O esteróide utilizado foi o decanoato de nandrolona, reconhecidamente o mais utilizado entre usuários abusivos.

Este estudo é o primeiro avaliando os efeitos do uso abusivo desse tipo de composto sobre diversos paradigmas comportamentais, assim como, sobre os principais receptores serotoninérgicos em diversas áreas cerebrais de camundongos, objetivando uma maior compreensão sobre a relação entre os esteróides anabolizantes e a serotonina na modulação de comportamentos emocionais.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do uso prolongado do esteróide androgênico decanoato de nandrolona (19-nortestosterona) em comportamentos emocionais de camundongos machos adultos jovens, e investigar os níveis de expressão gênica dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT₆ e 5HT₇, da proteína transportadora da serotonina 5-HTT e da enzima conversora de serotonina TPH2 em diversas áreas cerebrais.

Pretendemos assim, estabelecer um modelo em camundongos para o uso abusivo de esteróides anabólico-androgênicos e identificar relações entre as alterações comportamentais induzidas por sua administração prolongada e as alterações moleculares transcricionais referentes ao sistema serotoninérgico cerebral.

Métodos

1. Animais

Camundongos C57Bl/6J machos, adultos com cerca de 3 meses, provenientes de colônia estabelecida por nós no biotério do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da FMUSP e originária do Jackson Laboratories (Maine, USA), foram mantidos em gaiolas de polipropileno (28x17x12 cm), recebendo água e comida *ad libitum* em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas (claro às 7:00 hs) e com temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram manipulados de acordo com as normas de “Uso de Animais de Laboratório” do centro de Bioterismo da FMUSP, e todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo. Este estudo, Protocolo de Pesquisa nº 0390/07, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30 de maio de 2007 (Anexo I).

2. Drogas

Os animais experimentais foram tratados com decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Organon, Brasil), um derivado da testosterona muito utilizado entre atletas que fazem uso abusivo de esteróides anabolizantes. Os animais do grupo controle receberam administrações de óleo de gergelim, veículo no qual foi dissolvido o esteróide.

3. Delineamento Experimental

Os camundongos foram isolados nas gaiolas e divididos em dois grupos:

1) **esteróide** - injeção *sc* de 15 mg/kg/dia de decanoato de nandrolona em um vol de 10 ml/kg, durante 28 dias. A droga foi dissolvida em óleo de gergelim. $n= 23$.

2) **controle** - injeção *sc* diária de óleo de gergelim, 10 ml/kg, por 28 dias. $n= 26$

As injeções foram feitas 2 h após o início do ciclo claro. Este regime de tratamento seguiu aquele sugerido por Steensland e col. (2005), por simular o uso crônico da droga entre os usuários abusivos.

a. Testes Comportamentais: No 16º dia de tratamento, 13 animais do grupo esteróide e 16 do grupo controle passaram por uma bateria de 5 testes comportamentais, com intervalo de 2 dias entre cada teste. Os experimentos foram feitos entre 14 e 18h e a seqüência dos testes foi: campo-aberto, labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, residente-intruso e nado-forçado. A ordem escolhida para a bateria de testes pretendeu seguir uma ordem crescente de aversividade para minimizar interferências nos testes posteriores. Durante este período, os animais continuaram recebendo doses diárias do esteróide ou veículo. As análises foram feitas por 2 investigadores de maneira cega para as condições experimentais. Esses testes foram realizados em duas baterias experimentais, em momentos distintos. Na primeira bateria utilizou-se 9 camundongos (4 do grupo esteróide e 5 do grupo controle), e na segunda bateria 20 animais (9 e 11 por grupo respectivamente). Os animais foram testados de maneira alternada entre o grupo controle e esteróide e em ordem aleatória dentro de cada grupo.

b. Expressão Gênica: No 28º dia de tratamento, outros 10 animais de cada grupo (animais *näive*, ou seja, não passaram por nenhum procedimento experimental prévio) foram sacrificados por decapitação e imediatamente tiveram o sangue e cérebro coletados. Os sacrifícios foram feitos entre 14 e 18 h e as áreas cerebrais que foram estudadas: córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo, amígdala e mesencéfalo foram dissecadas sobre placa de *Petri* contendo gelo picado e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o uso.

4. Aparatos e Modelos Comportamentais

a. *Atividade Motora Espontânea no Campo-Aberto*

A atividade locomotora espontânea dos camundongos foi avaliada por meio de observação direta em um campo-aberto (DeFries & Weir, 1964). Nosso aparelho é constituído por uma arena quadricular de fórmica branca de 60 cm, dividida em 36 quadrantes e com paredes de 30 cm altura. Possui uma abertura superior que permite ao observador uma visão global do animal. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena, cada sessão de 5 min foi gravada em fitas de videocassete para conferência posterior. O campo-aberto foi limpo com uma solução de álcool 5% entre cada animal, para minimizar os odores emitidos pelo animal anterior.

Os parâmetros avaliados foram:

- a) frequência de locomoção, determinada pela contagem dos quadrantes nos quais o animal esteve com as quatro patas;
- b) frequência de levantar, ou seja, o número de vezes em que o camundongo ficou apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tocando ou não as paredes com as patas anteriores;
- c) latência para sair do centro do campo-aberto;
- d) permanência nos 20 quadrantes adjacentes às paredes da arena.

As observações dos animais do grupo controle e esteróide foram sempre intercaladas e a análise foi feita minuto a minuto em cada sessão.

b. *Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado*

O labirinto em cruz elevado utilizado foi construído a partir do descrito em Lister em 1987, com pequenas modificações. O aparato é feito de madeira recoberto por fórmica preta e consiste em dois braços abertos e dois braços fechados de 30 cm cada e

5 cm de largura, estando a 50 cm do solo. Os braços fechados possuem paredes de 15 cm de altura, e os braços abertos um pequeno degrau de 0,5 cm para minimizar possíveis quedas do camundongo. O ponto onde os braços se cruzam é formado por uma arena central de 5x5 cm, onde foi colocado o animal, de frente para o braço aberto. Seu comportamento foi observado e gravado por 5 min e o nível de luminosidade foi similar ao do biotério (60 lux).

Os parâmetros avaliados foram:

- a) latência para a fuga da área central;
- b) frequência de entradas com as quatro patas em cada braço;
- c) frequência de transições entre os braços;
- d) permanência em cada braço;
- e) tentativas de entrar no braço aberto;
- f) frequência de mergulhar a cabeça no braço aberto (“head dipping”).

c. Comportamento na Caixa Claro-Escuro

Para este teste foi utilizada uma caixa retangular de 44 x 21 cm e paredes de 21 cm feita de papelão plastificado. Apresenta uma divisória interna com uma pequena abertura inferior que possibilita o trânsito do camundongo entre as áreas, sendo que 1/3 representa uma área escura e fechada e 2/3 uma área branca e clara, iluminada com uma lâmpada de 20w a uma altura de 30cm do fundo da caixa (adaptado de Crawley & Goodwin, 1980). Os animais foram colocados individualmente no campo claro e observados e filmados durante 10 min.

Os parâmetros considerados foram:

- a) latência para sair do compartimento claro;
- b) frequência de transição entre as áreas;

- c) tempo de permanência na área clara;
- d) frequência de avaliação do risco, ou seja, protusão da cabeça através da abertura para a área clara, mantendo o corpo na área escura.

d. Verificação do Comportamento no Teste do Nado Forçado (Porsolt)

Este teste foi feito conforme aquele descrito por Porsolt e col. em 1977, com algumas modificações. Os animais foram colocados individualmente, pela cauda, em um cilindro de vidro de 40 cm de profundidade e 27 cm de diâmetro, preenchido com 30 cm de água a 24° C, trocada a cada animal. A sessão teve a duração de 6 min e foi filmada em fitas de vídeo.

Os parâmetros analisados foram:

- a) duração de imobilidade (somente os movimentos mínimos necessários para a flutuação);
- b) duração do nado (movimento das patas anteriores e posteriores dentro da água)

Para análise dos resultados consideramos somente os 4 min finais da sessão.

e. Comportamento Agressivo (Paradigma Residente-Intruso)

Os animais dos grupos controle e esteróide, que foram isolados em suas gaiolas no início do tratamento, foram chamados *residentes*. Na semana que precede o teste, suas gaiolas não foram limpas. Um camundongo macho jovem, não relacionado ao tratamento e mantido agrupado em gaiolas, e portanto não agressivo, foi colocado na gaiola do residente. Este *intruso* serviu como estímulo em cada pareamento de 15 min. Cada camundongo residente foi testado uma vez, e cada intruso foi utilizado uma única vez por dia de experimento.

Os confrontos foram gravados em fitas de vídeo e tiveram os seguintes parâmetros quantificados (conforme Chiavegatto *et al.*, 2001; Nelson & Chiavegatto, 2000):

- a) latência para o primeiro ataque;
- b) número de animais apresentando comportamento agressivo;
- c) número total de mordidas;
- d) duração total dos episódios de ataque (mordidas, ameaças laterais) iniciados pelo macho residente.

5. Preparação das Amostras para PCR em tempo real

a. *Homogeneização*

Os tecidos cerebrais congelados foram imersos em 1mL de TRIzol gelado (Invitrogen, Brazil) e homogeneizados por 20 seg em velocidade máxima (Polytron PT10/35- Brinkmann, NY).

b. *Extração do RNA Total*

As amostras homogeneizadas foram mantidas a 15-30°C por 5 min para permitir a completa dissociação de complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio, e as amostras homogeneizadas e centrifugadas (12.000g, 4°C, 15 min). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido (fase aquosa que contém o RNA). A precipitação do RNA foi feita pela adição de 1mL de álcool isopropílico. Segue-se uma incubação a 4°C por 10 min e centrifugação de 12.000g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, permanecendo apenas o precipitado de RNA; este foi lavado com 1mL de etanol 75% em água isenta de RNases. As amostras foram centrifugadas a 7.500g, 4°C por 5 min e o sobrenadante desprezado; o precipitado de RNA foi ressuscitado em água livre de RNases, em volume variando de 30 a 50 µl, de

acordo com o tamanho inicial da estrutura, tendo sua concentração sido determinada a partir da medida de absorvância a 260 nm. Preparações com uma razão de densidade óptica 260/280 nm < 1,7 (um dos critérios de pureza da amostra) foram descartadas. As soluções de RNA foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até o uso.

c. Tratamento por DNase

Foram aliquotados 4 µg de RNA total extraído das amostras, padronizados para um volume de 11,5 ml, e tratados com a enzima DNase (Promega, Brasil). Esse passo é importante para reduzir qualquer contaminação da amostra por DNA genômico proveniente da extração. As amostras contendo 4 µg de RNA total, 4U da enzima DNase (1U/µl), 0,5 µl de RNase out (Invitrogen, Brasil) e 2,0 µl de Buffer 10x foram incubadas por 30 min a 37°, sendo posteriormente adicionados 2 µl de DNase Stop Solution (Promega, Brasil), sendo incubadas por mais 15 min.

Após as incubações as amostras passaram por um processo de purificação, onde as amostras tiveram seu volume ajustado para 100 µl e adicionados 50 µl de fenol e 50 µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (14.000g, 4°C, 5 min), a fase superior foi retirada e o restante descartado. Foi adicionado 100 µl de clorofórmio e novamente centrifugada (14.000g, 4°C, 5 min), sendo a fase de cima transferida para outro tubo de 1,5 ml. Foram adicionados então 250 µl de etanol absoluto para a precipitação do RNA e novamente centrifugado (14.000g, 4°C, 10 min). Após a precipitação a fase líquida foi descartada e o tubo colocado de boca para baixo sobre um lenço de papel para secagem.

O *pellet* de RNA precipitado foi ressuspenso em 20 µl de água livre de RNase por 2 h na câmara fria, e posteriormente analisado em gel de agarose quanto sua integridade e quantificado em espectrofotômetro.

d. *Síntese do cDNA (RT-PCR)*

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 2µg do RNA tratado com DNase, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 0,5µg de oligo(dT), 0,5mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 200U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Brazil), em um volume total de 20µl. Primeiramente o RNA e o oligo(dT) foram aquecidos a 70°C por 10 min e colocados no gelo até a adição dos demais componentes. A reação foi incubada a 42°C por 1 hora e interrompida pelo aquecimento a 70°C por 15 min. O produto de cDNA foi tratado com 2U de RNaseH (Invitrogen) a 37°C por 20 min para remoção do RNA remanescente, com posterior inativação da enzima por aquecimento a 70°C por 15 min, e armazenado a -80°C até o uso.

e. *PCR em Tempo Real*

A análise da expressão gênica foi feita através do PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As reações de qPCR foram feitas no equipamento *Rotor Gene 3000* (Corbett Research, Concord, Australia). O qPCR determina o Ct para cada amostra, ou seja, o ciclo de amplificação onde o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (*threshold*). O resultado é coletado durante a fase exponencial de amplificação, que é quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra. Os primers *sense* e *antisense* específicos para cada gene de interesse dos camundongos (*Mus musculus*) e para genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e sua especificidade verificada através do *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As reações continham 200nM de primers, sais, deoxinucleotídeos, a enzima *AmpliTaq Gold* DNA polimerase,

o composto fluorescente *Sybr Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX, otimizados para um volume final de 20 μ l. Para a escolha da concentração ideal de DNA a ser amplificado, foram feitas 5 diluições seriadas do cDNA obtido das amostras, 50ng, 25ng, 12.5ng, 6.25ng e 3.125ng. Após a análise da curva padrão de amplificação com as diluições para cada par de primer, escolheu-se a de 12,5 ng, aquela com maior eficiência para a concentração de trabalho. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min para a ativação da enzima DNA polimerase, seguido por 45 ciclos de: a) 15 seg a 95°C para desnaturação, b) 60 seg a 60°C para anelamento, extensão e coleta do sinal de fluorescência. Para cada corrida tivemos os controles negativos NTC (ausência do DNA), NAC (ausência primers) e uma amostra de RNA total (controle negativo para presença de DNA genômico contaminante). As amostras referentes ao grupo controle e experimental para cada gene foram processadas sempre na mesma corrida, ou seja, no mesmo set de microtubos e em triplicata. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95°C por 15 seg, estabilização a 60oC seguido de aumento gradual de temperatura de 2°C por min). Assim, somente foram utilizados os primers cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta. O software RG-3000 (Corbett Research, Concord, Austrália) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação, bem como suas análises. A quantidade de transcrito em cada amostra foi determinada, relativamente, utilizando o *aplet geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e baseada no Ct de cada amostra.

6. Determinação da concentração hormonal androgênica plasmática

O plasma separado do sangue dos animais foi purificado por fenol/clorofórmio para retirar impurezas que pudessem interferir na leitura. A concentração hormonal androgênica foi determinada no plasma através de um imunoenensaio enzimático (Testosterone EIA Kit, Cayman Chemical, Michigan, USA), baseado na competição entre os compostos androgênicos e um conjugado (marcador) de testosterona-acetilcolinesterase (AChE) por um número limitado de sítios de ligação específicos para testosterona em anti-soro de coelho. Como a concentração do marcador foi sempre mantida constante enquanto a concentração dos compostos androgênicos das amostras experimentais variou, a quantidade de marcador que é capaz de se ligar aos sítios do anti-soro de coelho foi inversamente proporcional à quantidade de andrógenos ligantes (B). Esses reagentes foram colocados então em uma micro-placa contendo anticorpos monoclonais de camundongo anti-coelho IgG que se liga a esse complexo de anti-soro de coelho ligado ao marcador ou aos compostos androgênicos, assim como padrões contendo diluições seriadas de antígenos marcados fornecidos pelo kit. Essa micro-placa foi então incubada por duas horas à temperatura ambiente, lavada, e incubada novamente por 90 minutos em ambiente escuro com o reagente revelador da reação (composição). Ao final da incubação a micro-placa foi lida em um espectrofotômetro (Wallace 1420 VICTOR, PerkinElmer Life Sciences, Turku, Finland) em comprimento de onda entre 405 e 420 nm. As concentrações de compostos androgênicos nas amostras de plasma foram determinadas através de curva-padrão obtida por diluições seriadas. Este ensaio apresenta limite de detecção de 6pg/ml (80% B/B₀ - sendo B₀ o marcador de máxima ligação) com coeficiente de variação intra e inter ensaios variando de 8 a 15%. A especificidade é de 100% para testosterona, 99% para nandrolona, 27,4% para 5 α -dihidrotestosterona e 18,9% para 5 β -dihidrotestosterona de acordo com o fabricante.

Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados com relação à normalidade de distribuição dos dados numéricos (teste Kolmogorov-Smirnov). Para aqueles com distribuição paramétrica foi utilizado o teste *t* de Student, para os não-paramétricos foi utilizado o teste *U* de Mann-Whitney (software GraphPad InStat® versão 3.05, USA). O ganho de peso dos animais foi analisado através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas (fatores: tempo e tratamento) seguido pelo teste de Bonferroni através do pacote estatístico SPSS 13.0 (LEAD Technologies, Inc. USA). O número de animais que apresentou comportamento agressivo foi analisado através do teste Chi-Quadrado (GraphPad InStat® versão 3.05, USA).

As comparações foram feitas entre o grupo controle e esteróide e utilizou-se Média ± Erro Padrão para sua apresentação. A significância estatística foi considerada para $p \leq 0.05$ em relação ao grupo controle.

Resultados

Foram utilizadas duas séries distintas de camundongos para analisar os parâmetros comportamentais e para a expressão gênica no cérebro, sendo que ambas continham animais do grupo controle e esteróide. Desta forma, a análise da expressão gênica deve refletir o efeito do tratamento com o esteróide.

1. Aspectos Fisiológicos e Comportamentais

1.1. Medida do peso corpóreo dos animais ao longo do tratamento

Os animais foram pesados uma vez por semana, sempre no mesmo horário, desde o início do tratamento. Antes do tratamento, e também até o final da primeira semana, os animais não apresentaram diferença na média de peso corporal entre os grupos. A partir do início da segunda semana, o grupo tratado com o esteróide (n=23) apresentou um aumento significativo em relação ao controle (n=26) que se manteve até o final do tratamento ($F_{(1,27)} = 7,01$, $p < 0,05$ para o tratamento; $F_{(4,140)} = 38,20$, $p < 0,01$ para o tempo; e $F_{(4,140)} = 13,89$, $p < 0,01$ para a interação entre as variáveis. **Figura 5**).

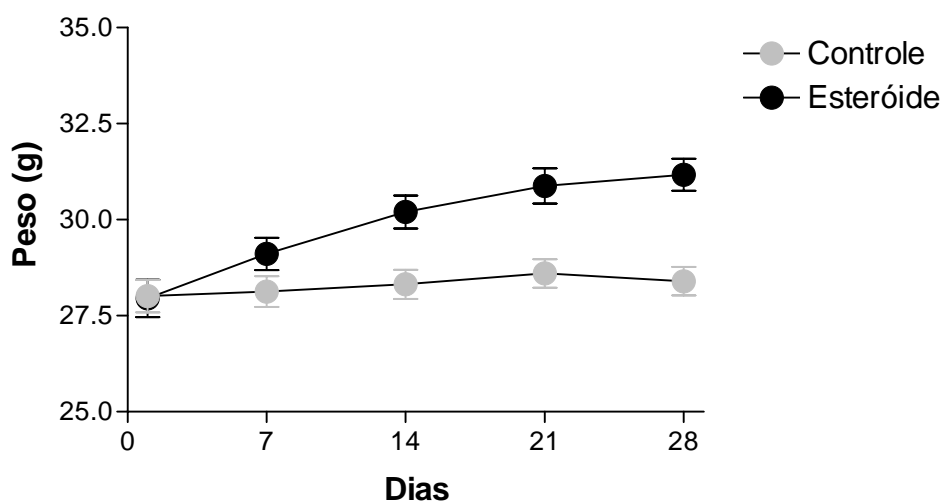


Figura 5. Efeito do tratamento diário com o esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) sobre o peso corporal de camundongos machos adultos ($p < 0,05$ para o tratamento; $p < 0,01$ para o tempo e para a interação, ANOVA de 2 vias e medidas repetidas)

1.2. Atividade motora espontânea no campo aberto

No 16^o dia de tratamento, os animais passaram pelo teste de atividade motora no campo aberto. A locomoção total do grupo esteróide (n=13) apresentou-se aumentada quando comparada a do grupo controle (n=16) (total de quadrantes percorridos ao longo dos 5 minutos de teste; $p < 0,05$; **Figura 6, à esquerda**), sendo que esta atividade ocorreu preferencialmente nos quadrantes adjacentes à parede do aparato (demonstrado pelo tempo gasto na locomoção periférica, $p < 0,05$; **Figura 6, inferior**). O comportamento de levantar apresentou uma tendência a aumento ($p = 0,06$) no grupo esteróide (**Figura 6, à direita**). A latência em segundos para deixar o centro da arena foi de $22,22 \pm 3,28$ para o grupo esteróide e de $31,64 \pm 5,21$ para o controle ($p > 0,05$).

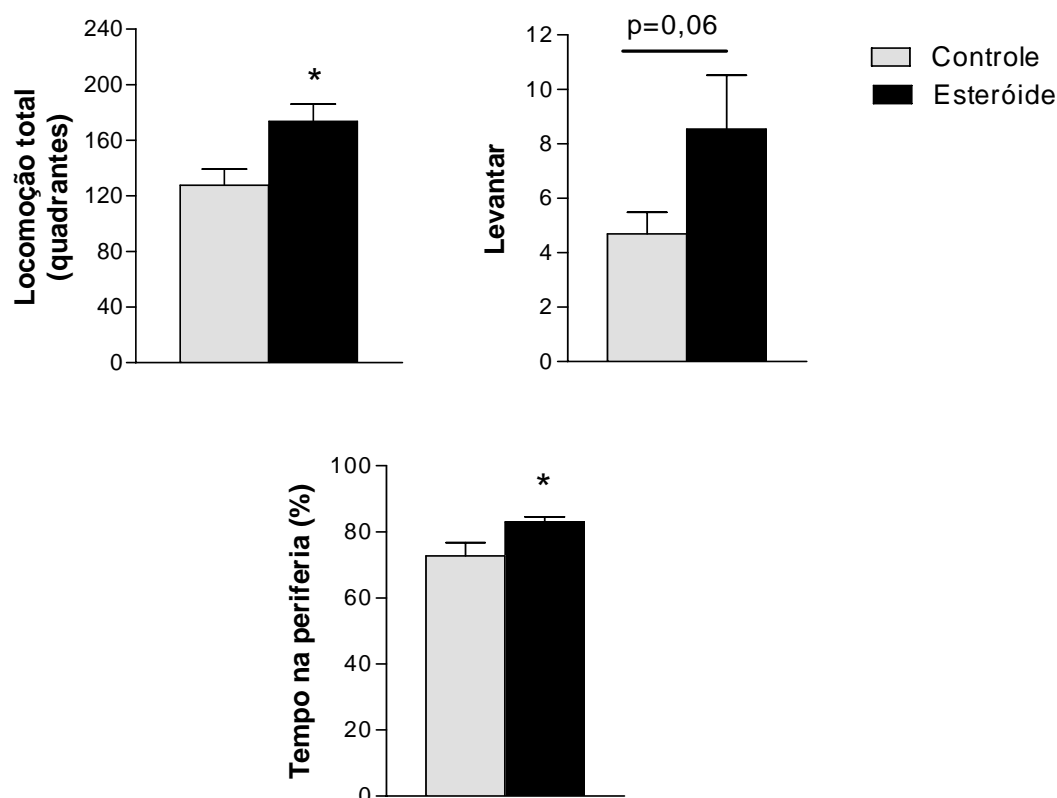


Figura 6. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) na locomoção total, freqüência de levantar e porcentagem de tempo na periferia de um campo aberto por 5 min, no 16^o dia de tratamento em camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p < 0,05$, teste *t* Student.

1.3. Comportamento no labirinto em cruz elevado

No 19º dia de tratamento, os animais foram testados quanto à presença de comportamentos relacionados à ansiedade no modelo do labirinto em cruz elevado. Os resultados mostram uma diminuição na latência para deixar o centro do aparato no grupo esteróide (n=12) em relação ao grupo controle (n=16) ($p < 0,05$; **Figura 7 superior esquerda**) e um aumento nas tentativas de entrada no braço aberto ($p < 0,01$; **Figura 7 superior direita**). Apesar do número de transições entre os braços ser semelhante em ambos os grupos ($p > 0,05$; **Figura 7 inferior direita**), o tempo gasto no braço aberto e área central (aversivas) foram reduzidas ($p < 0,05$) (**Figura 7 inferior esquerda**). A frequência de entradas no braço aberto e de mergulhar a cabeça não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (**Tabela 4**).

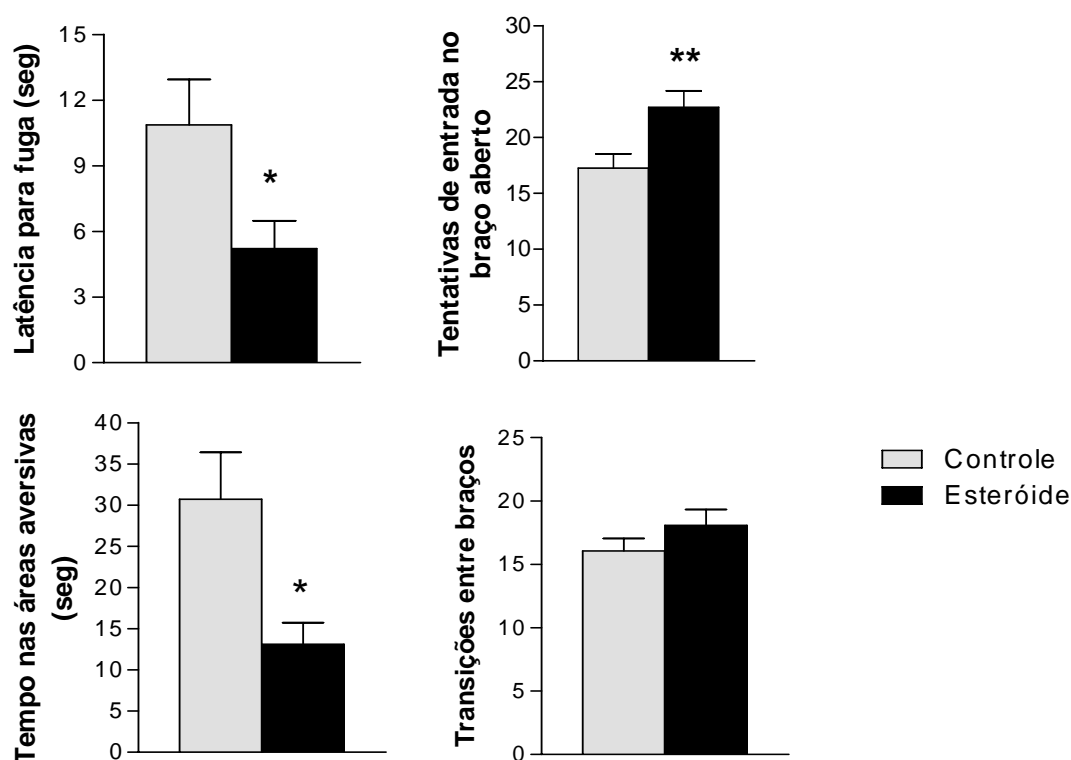


Figura 7. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) sobre comportamentos relacionados à ansiedade observados por 5 min em um labirinto em cruz elevado, no 19º dia de tratamento em camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste *t* Student.

Tabela 4. Dados comportamentais adicionais observados no labirinto em cruz elevado.

	Frequência de entrada no braço aberto	Frequência de mergulhar a cabeça
Controle	2,06 ± 0,51	13,00 ± 1,49
Esteróide	1,69 ± 0,46	11,77 ± 1,34

1.4. Atividade na caixa claro-escuro

A atividade na caixa claro-escuro foi avaliada no 22^o dia de tratamento. Todos os parâmetros analisados foram semelhantes entre os grupos controle (n=13) e esteróide (n=16) ($p>0,05$) (**Figura 8**). A latência em segundos para deixar o compartimento claro foi de: $18,49 \pm 5,10$ para o controle e $10,44 \pm 1,81$ para o grupo esteróide ($p>0,05$).

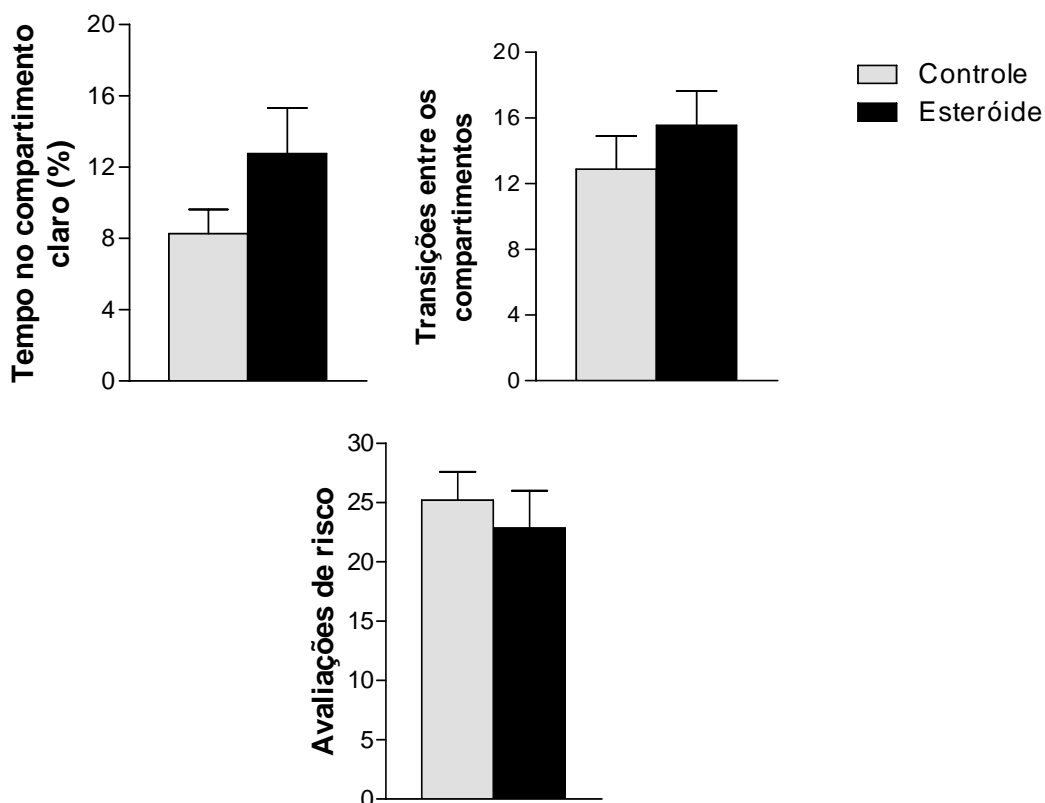


Figura 8. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) sobre a atividade na caixa claro-escuro, observados por 15 min, no 22^o dia de tratamento em camundongos machos adultos ($p>0,05$; teste *t* Student).

1.5. Imobilidade no teste de nado forçado (Porsolt)

A duração de imobilidade no teste de nado forçado foi avaliada no 25º dia de tratamento com o esteróide. A análise dos 4 últimos minutos do teste mostrou uma diminuição na imobilidade do grupo esteróide (n=13) em relação ao grupo controle (n=16) ($p<0,05$) (**Figura 9**).

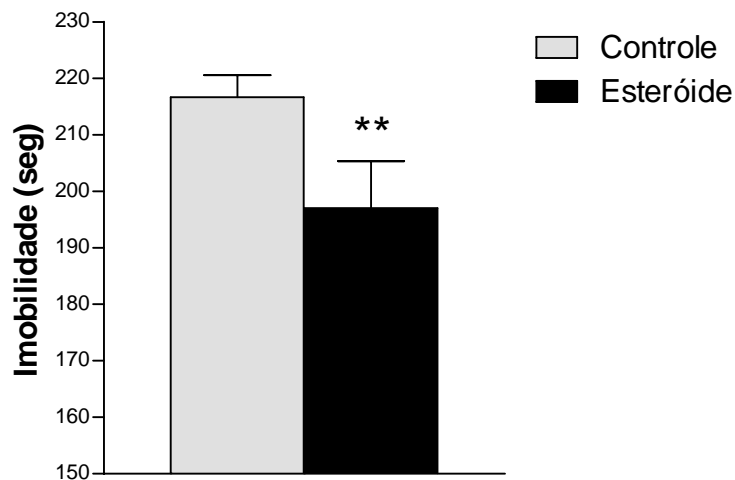


Figura 9. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) em camundongos machos adultos sobre a duração de imobilidade no teste de nado forçado, observando os 4 últimos minutos de teste realizado ao 25º dia de tratamento com o esteróide. Média \pm EPM; * $p<0,05$, teste *t* Student.

1.6. Comportamento agressivo (Residente-Intruso)

O paradigma residente-intruso foi realizado no 28º dia de tratamento, onde os animais testados foram pareados com animais dóceis por 15 min. Os resultados mostraram uma diminuição na latência para o primeiro ataque no grupo esteróide (n=13) comparados ao grupo controle (n=16) ($p<0,01$), bem como um maior número de animais tratados com esteróide apresentaram comportamento agressivo ($p<0,05$) (**Figura 10**). O número de mordidas e o tempo de interações agressivas (pareamento

lateral, ato de coçar violento, monta e enrijecimento de cauda, com ausência de ataque) não diferiram entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela 5).

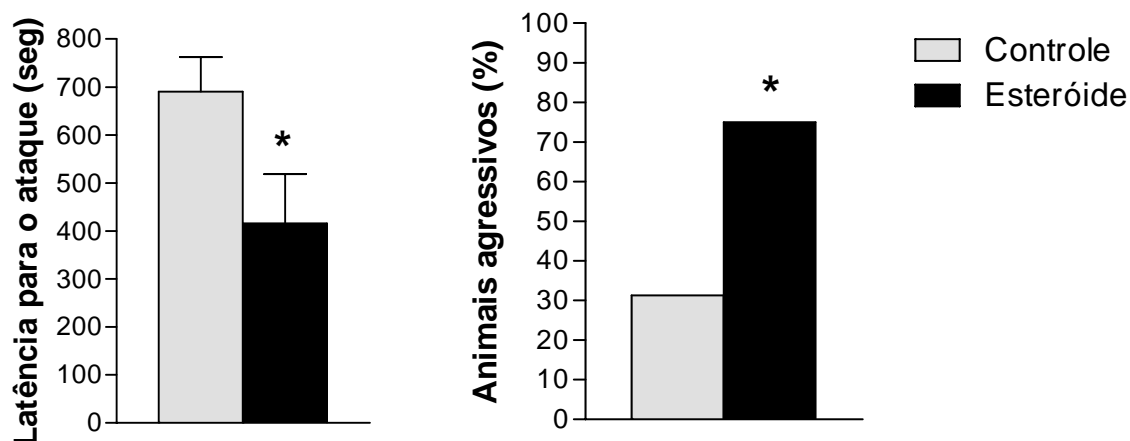


Figura 10. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) sobre a latência para o primeiro ataque e a proporção de animais agressivos no paradigma residente-intruso, no 28º dia de tratamento em camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, teste *t* Student e Chi-quadrado.

Tabela 5. Dados comportamentais adicionais observados no paradigma residente-intruso

	Número total de ataques (mordidas)	Tempo de interação agressiva sem mordidas (seg)
Controle (n=13)	9,31 \pm 4,04	126,25 \pm 29,52
Esteróide (n=16)	14,25 \pm 4,65	103,37 \pm 26,52

2. Análise de expressão gênica diferencial

Para cada estrutura cerebral, a quantidade de transcrito (referente ao RNAm) de cada gene foi calculada através da normalização dos resultados brutos pela expressão de genes que não se alteraram nessas regiões com o tratamento realizado. Para cada região cerebral foram testados 4 genes de referência: Ppia (ciclofilina), Hprt1 (hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase 1), Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e

Actb (β -actina). Utilizou-se o *aplet geNorm*, que através de comparações pareadas sugere os genes mais estáveis em cada amostra

2.1 Pares de *primers* utilizados para a amplificação dos genes

Tabela 6. Sequência dos pares de *primers* utilizados para *qPCR*

RNA ^m *	GENE	SEQUÊNCIAS <i>SENSE</i> / <i>ANTISENSE</i> (5' → 3')
NM_008308	htr1a	GGATGTTTTCTGTCTGGT / CACAAGGCCTTTCCAGAACT
NM_010482	htr1b	TCACATGGCCATTTTTGACT / CAGTTTGTGGAACGCTTGTT
NM_172812	htr2a	AGAACCCATTACCCATAGC / ATCCTGTAGCCC GAAGACTG
NM_008312	htr2c	AGCAGTGCGTAGTCCTGTTG / CTTTCGTCCCTCAGTCCAAT
NM_013561	htr3a	CATAAATCAGGGCGAGTGG / GATACTGGGCAGCAAGAGG
NM_021358	htr6	CATAGCTCAGGCCGTATGTG / CGCATGAAGAGGGGATAGA
NM_008315	htr7	GGCCTGAGAGAAGCGAGTT / TTCGTTGTTTCCCCCTGT
NM_010484	slc6a4	CAACTCCGGCTTTTCCAATA / ATTTCCGTTGGTGTTCAGG
NM_173391	tph2	TGCAAGCAAGAGGGTCAACT / CATGCTTCAATTCTCCGATG
NM_008907	ppia	AATGCTGGACCAAACACAAA / CCTTCTTTCACCTTCCCAAA
NM_013556	hprt1	TGTTGTTGGATATGCCCTTG / GCGCTCATCTTAGGCTTTGT
NM_008084	gapdh	AGGAGCGAGACCCCACTAAC / GTGGTTCACACCCATCACAA
NM_007393	actb	GTGGGAATGGGTCAGAAGG / GGTCATCTTTTACGGTTGG

* Sequências obtidas no Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI, EUA)

2.2 Genes de referência utilizados em cada estrutura encefálica

A tabela abaixo (**Tabela 7**) apresenta os transcritos normalizadores, ou seja, os genes mais estáveis que serviram de controle interno para cada estrutura cerebral.

Tabela 7. Genes de referência escolhidos

Estruturas	Controle Interno
Córtex Pré-Frontal	actb
Hipotálamo	hprt1, gapdh
Hipocampo	hprt1, actb
Amígdala	ppia, hprt1

2.3 Expressão gênica no córtex pré-frontal

Os camundongos tratados por 28 dias com injeções diárias de 15mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a e htr7 no córtex pré-frontal quando comparados ao grupo controle (**Figura 11; Tabela 8**). As porcentagens de diminuição observadas foram: htr1a 62,9% ($p < 0,01$), htr1b 58,8% ($p < 0,01$), htr2a 52,9% ($p < 0,01$) e htr7 42,4% ($p < 0,05$). Os demais transcritos htr2c, htr3a e htr6 não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$; **Figura 11; Tabela 8**).

Córtex Pré-frontal

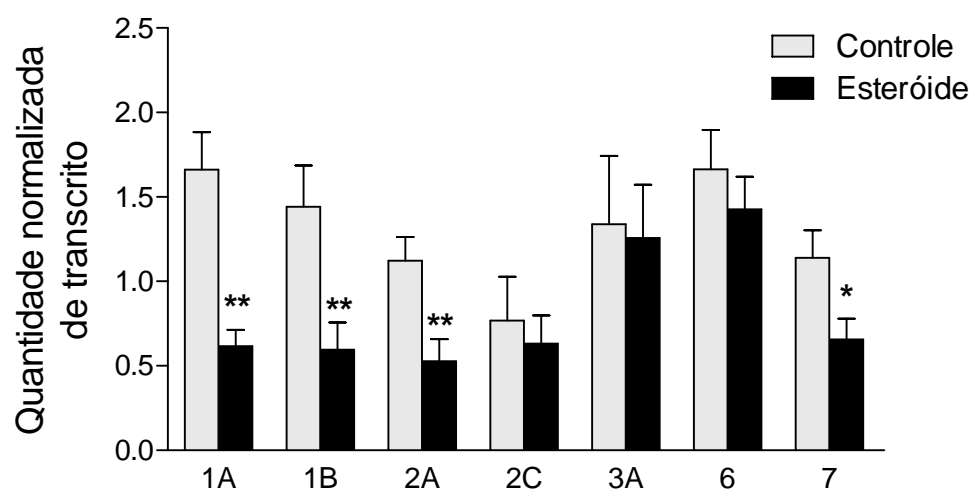


Figura 11. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no córtex pré-frontal de camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste *t* Student.

Tabela 8. Quantidade de transcrito (valor normalizado) dos genes htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no córtex pré-frontal de camundongos machos adultos após a administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias. Média \pm EPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste *t* Student.

	Controle	Esteróide
htr1a	1,66 \pm 0,22	0,62 \pm 0,10 **
htr1b	1,44 \pm 0,24	0,60 \pm 0,16 **
htr2a	1,12 \pm 0,14	0,53 \pm 0,13 **
htr2c	0,77 \pm 0,26	0,63 \pm 0,17
htr3a	1,34 \pm 0,41	1,26 \pm 0,32

htr6	1,66 ± 0,23	1,43 ± 0,19
htr7	1,14 ± 0,16	0,66 ± 0,12 *

2.4 Expressão gênica no hipotálamo

Os camundongos tratados por 28 dias com injeções diárias de 15mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram alteração estatisticamente significativa na quantidade dos transcritos htr1b e htr6 no hipotálamo, quando comparados aos animais do grupo controle (**Figura 12; Tabela 9**). Estas alterações foram representadas pela redução de 51,5% na expressão do htr1b ($p < 0,05$) e um aumento de 44,3% para o htr6 ($p < 0,05$). Os demais transcritos htr1a, htr2a, htr2c, htr3a e htr7 não foram diferentes entre os grupos nesta região ($p > 0,05$; **Figura 12; Tabela 9**).

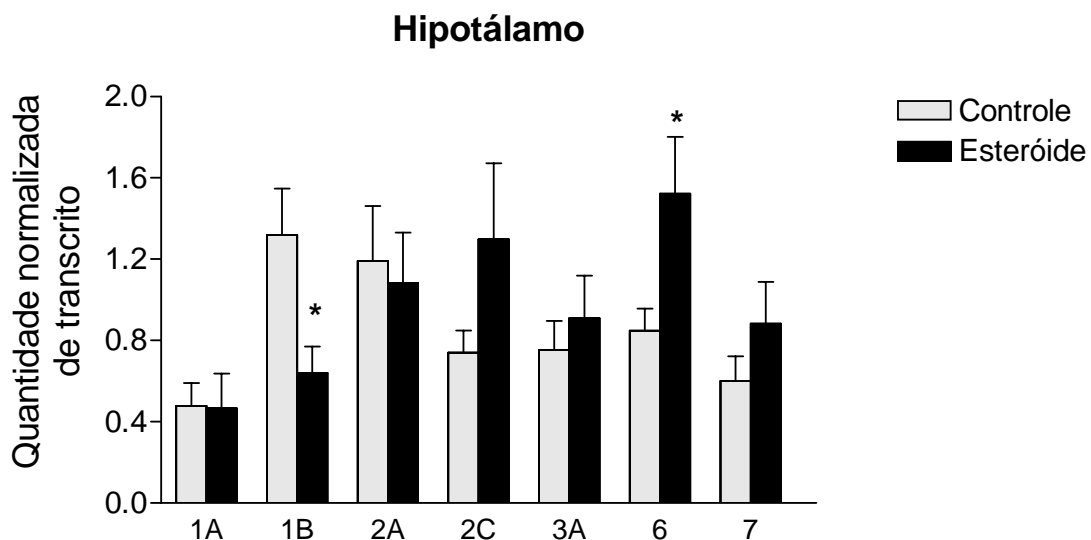


Figura 12. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no hipotálamo de camundongos machos adultos. Média ± EPM; * $p < 0,05$; teste *t* Student.

Tabela 9. Quantidade de transcrito (valor normalizado) dos genes htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no hipotálamo de camundongos machos adultos após a administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias. Média \pm EPM; * $p < 0,05$, teste *t* Student.

	Controle	Esteróide
htr1a	0,48 \pm 0,11	0,47 \pm 0,17
htr1b	1,32 \pm 0,23	0,64 \pm 0,13 *
htr2a	1,19 \pm 0,27	1,08 \pm 0,25
htr2c	0,74 \pm 0,11	1,30 \pm 0,37
htr3a	0,75 \pm 0,14	0,91 \pm 0,21
htr6	0,85 \pm 0,11	1,52 \pm 0,28 *
htr7	0,60 \pm 0,12	0,88 \pm 0,21

2.5 Expressão gênica no hipocampo

Os camundongos tratados por 28 dias com injeções diárias de 15mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram redução estatisticamente significativa de 36,6% na quantidade do transcrito htr1b no hipocampo, quando comparados aos animais do grupo controle (**Figura 13; Tabela 10**). Os demais transcritos htr1a, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 não diferiram entre os grupos nesta região ($p > 0,05$; **Figura 13; Tabela 10**).

Hipocampo

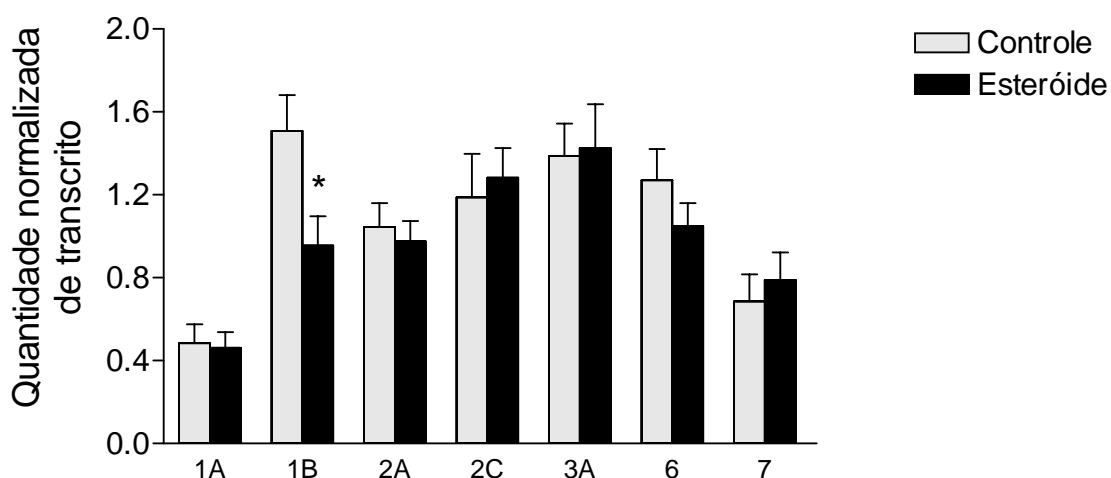


Figura 13. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no hipocampo de camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p < 0,05$; teste *t* Student.

Tabela 10. Quantidade de transcrito (valor normalizado) dos genes htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no hipocampo de camundongos machos adultos após a administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias. Média \pm EPM; * $p < 0,05$, teste *t* Student.

	Controle	Esteróide
htr1a	0,48 \pm 0,09	0,46 \pm 0,07
htr1b	1,51 \pm 0,17	0,96 \pm 0,14 *
htr2a	1,04 \pm 0,12	0,98 \pm 0,10
htr2c	1,19 \pm 0,21	1,28 \pm 0,14
htr3a	1,39 \pm 0,16	1,42 \pm 0,21
htr6	1,27 \pm 0,15	1,05 \pm 0,11
htr7	0,69 \pm 0,13	0,79 \pm 0,13

2.6 Expressão gênica na amígdala

Os camundongos tratados por 28 dias com injeções diárias de 15mg/kg de decanoato de nandrolona apresentaram redução estatisticamente significativa na quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr6 e htr7 na amígdala, quando comparados aos animais do grupo controle (**Figura 14; Tabela 11**). As porcentagens de diminuição observadas foram: htr1a 48,4% ($p<0,01$), htr1b 46,0% ($p<0,05$), htr2a 36,5% ($p<0,05$), htr2c 66,4% ($p<0,01$), htr6 42,36% ($p<0,05$) e htr7 61,0% ($p<0,01$). O transcrito htr3a não diferiu entre os grupos nesta região ($p>0,05$; **Figura 14; Tabela 11**).

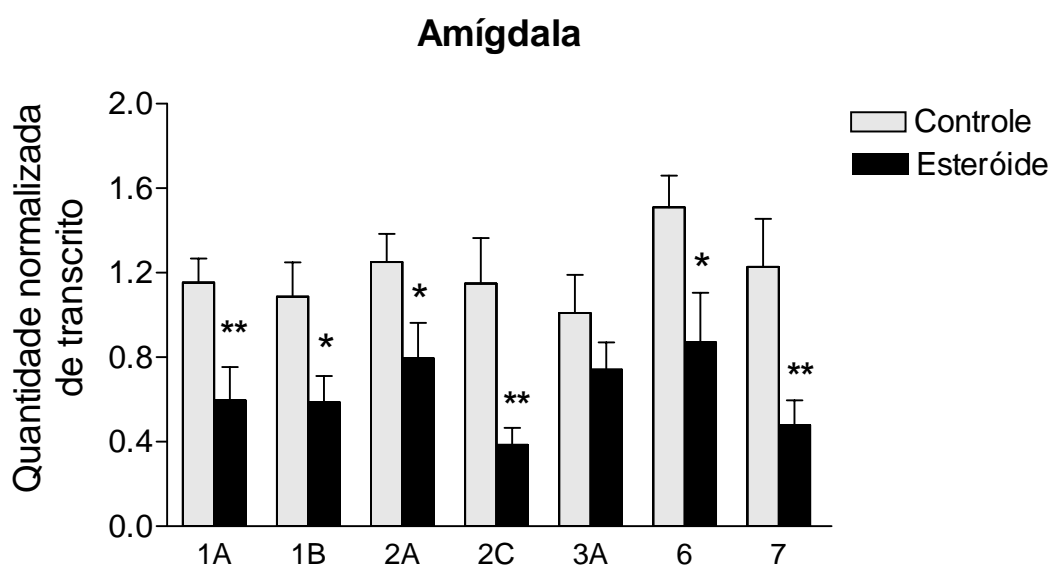


Figura 14. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a quantidade dos transcritos htr1a, 1b, 2a, 2c, 3a, 6 e 7 na amígdala de camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p<0,05$; ** $p<0,01$, teste *t* Student.

Tabela 11. Quantidade de transcrito (valor normalizado) dos genes htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 na amígdala de camundongos machos adultos após a administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias. Média \pm EPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, teste *t* Student.

	Controle	Esteróide
htr1a	1,15 \pm 0,11	0,60 \pm 0,16 **
htr1b	1,09 \pm 0,16	0,59 \pm 0,12 *
htr2a	1,25 \pm 0,13	0,79 \pm 0,17 *
htr2c	1,15 \pm 0,22	0,39 \pm 0,08 **
htr3a	1,01 \pm 0,18	0,74 \pm 0,13
htr6	1,51 \pm 0,15	0,87 \pm 0,24 *
htr7	1,23 \pm 0,23	0,48 \pm 0,12 **

2.7 Expressão gênica no mesencéfalo

A administração prolongada do esteróide anabolizante não resultou em nenhuma diferença estatisticamente significativa na quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6 e htr7 no mesencéfalo dos camundongos quando comparados aos do grupo controle (**Figura 15; Tabela 12**). Os transcritos referentes ao transportador (htt) e à enzima de síntese da serotonina (tph2), também não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$; **Figura 15; Tabela 12**).

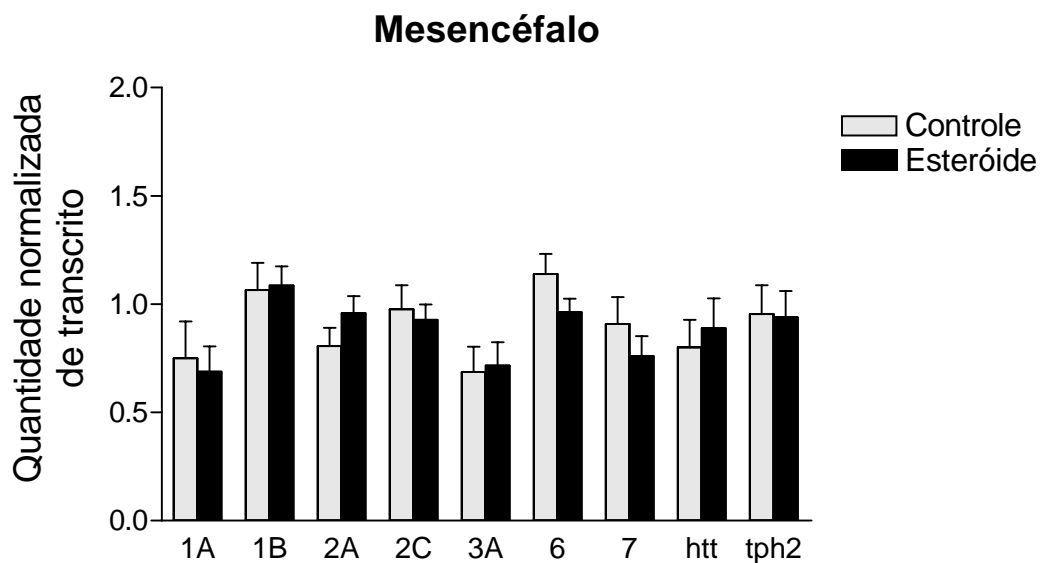


Figura 15. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a quantidade dos transcritos htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6, htr7, htt e tph2 no mesencéfalo de camundongos machos adultos. Média \pm EPM.

Tabela 12. Quantidade de transcrito (valor normalizado) dos genes htr1a, htr1b, htr2a, htr2c, htr3a, htr6, htr7, htt e tph2 no mesencéfalo de camundongos machos adultos após a administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias. Média \pm EPM.

	Controle	Esteróide
htr1a	0,73 \pm 0,17	0,79 \pm 0,13
htr1b	1,03 \pm 0,12	1,13 \pm 0,08
htr2a	0,80 \pm 0,09	0,96 \pm 0,08
htr2c	0,95 \pm 0,11	1,07 \pm 0,14
htr3a	0,70 \pm 0,13	0,69 \pm 0,11
htr6	1,13 \pm 0,09	1,03 \pm 0,10

htr7	0,88 ± 0,12	0,79 ± 0,09
htt	0,74 ± 0,11	0,85 ± 0,15
tph2	0,90 ± 0,12	1,02 ± 0,14

3. Determinação da concentração de compostos androgênicos plasmáticos

Os valores obtidos pela leitura da micro-placa utilizando comprimento de onda de 420 nm para as amostras experimentais (B) foram divididos pelo valor corrigido do marcador de máxima ligação (B_0), subtraído do marcador de ligação inespecífica (NSB). Utilizando a leitura das diluições seriadas dos padrões contidos na micro-placa, a curva de regressão $y = -0,7819\ln(x) + 2,7219$ foi formulada e os valores da $\%B/B_0$ submetidos à mesma para obtenção das concentrações plasmáticas dos compostos androgênicos. O grupo tratado com o esteróide anabolizante apresentou uma quantidade muito alta de andrógenos livres no plasma, significativamente maior que a concentração encontrada no plasma do grupo controle ($8,96 \pm 4,74$ vs $29,16 \pm 6,79$ pg/ml, controle vs tratado, $p < 0,05$; **Figura 16**). Posteriormente, novo teste foi realizado utilizando as mesmas amostras e o resultado confirmado.

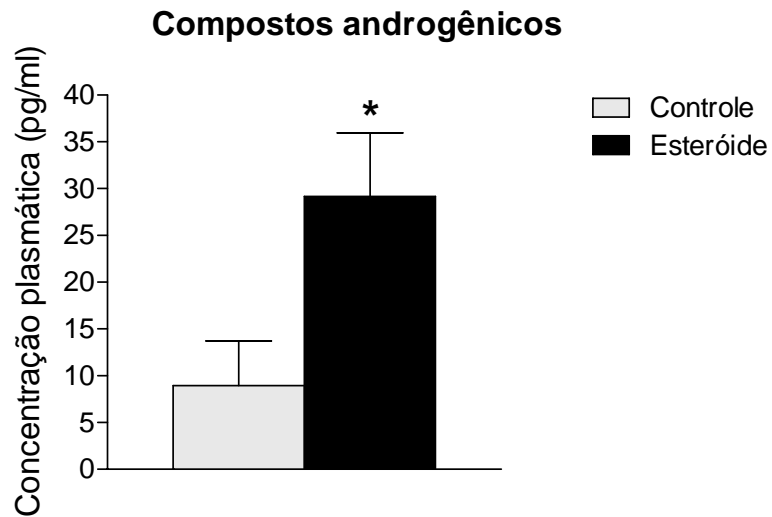


Figura 16. Efeitos da administração diária do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona (15mg/kg) por 28 dias sobre a concentração plasmática de compostos androgênicos em camundongos machos adultos. Média \pm EPM; * $p < 0,05$, teste *t* Student.

Discussão

O presente estudo revelou alterações comportamentais associadas a distúrbios transcricionais do sistema serotoninérgico em diferentes áreas cerebrais de camundongos devido à administração prolongada de altas doses de nandrolona. Esta é a primeira investigação que abrange diversos transcritos de receptores de 5-HT em várias regiões cerebrais relacionadas à regulação de emoções em camundongos machos sob concentrações suprafisiológicas de EAA. Nossas descobertas são importantes para embasar os efeitos psiquiátricos observados em humanos que abusam de EAA e ainda relacionar os receptores de 5-HT, especialmente o subtipo pós-sináptico 1B, em substratos neuronais específicos.

O tratamento com o esteróide foi iniciado em animais que apresentavam pesos corporais similares aos animais pertencentes ao grupo controle, porém a administração do decanoato de nandrolona promoveu um aumento de peso a partir da terceira semana de administração diária, mantendo-se até o final do tratamento. Em humanos o decanoato de nandrolona parece promover um aumento na ingestão alimentar, além de ter como possível efeito colateral a retenção de líquido e sais no tecido muscular (informações que acompanham o Deca-Durabolin®, fornecidas pela Organon, Brasil). Provavelmente estes efeitos anabólicos também sejam os responsáveis pelo aumento do peso corpóreo dos camundongos de nosso estudo, porém a investigação dos mecanismos reais foge do escopo do trabalho. A simples constatação do aumento de peso, bem como análises hormonais realizadas indicando alta concentração de hormônios androgênicos no plasma dos animais tratados com o esteróide anabolizante foi um dado útil para confirmar a homogeneidade da dose do esteróide e eficácia do tratamento suprafisiológico dos animais.

1- Comportamentos emocionais

O primeiro efeito comportamental observado foi um aumento da atividade motora dos animais tratados. O incremento na atividade foi evidenciado pelo maior número de quadrantes percorridos (aumento na locomoção total) e pela tendência a aumento no comportamento de levantar no teste do campo aberto. Entretanto, essa hiperatividade foi observada preferencialmente na região periférica do aparato (quadrantes adjacentes às paredes do mesmo, considerada a área menos aversiva ao animal), indicando um aumento no comportamento típico de ansiedade nestes animais tratados com o esteróide anabolizante.

Este comportamento de medo/ansiedade também foi verificado no labirinto em cruz elevado, através da maior rapidez para a fuga do centro do aparato (local onde os animais são colocados no início do teste), na redução do tempo gasto no braço aberto (área mais aversiva) e também pelo maior comportamento de avaliação de risco (tentativas de saída ao braço aberto, nas quais o animal se posiciona no centro do aparato e investiga a região aberta sem adentrá-la). Curiosamente, este mesmo perfil comportamental dos animais que receberam o esteróide não foi observado no teste da caixa claro-escuro, teste realizado para investigar o comportamento típico de ansiedade em animais experimentais, uma vez que todos os parâmetros avaliados neste aparato foram similares entre os grupos.

Estes testes clássicos são utilizados há muitos anos para a identificação do efeito ansiolítico de drogas, porém o labirinto em cruz elevado para camundongos (Lister, 1987) e a caixa claro-escuro (Crawley & Goodwin, 1980) utilizam parâmetros diferentes para avaliar a mesma categoria comportamental. No labirinto em cruz elevado existem três tipos de estímulos operantes: a novidade de um ambiente que se modifica conforme é explorado (braço aberto, braço fechado, intersecção e o vazio ao

redor do braço aberto), a ausência de tigmotaxia na intersecção (centro) e nos braços abertos (o ato do animal andar encostando-se à parede, tocando-a de leve com as vibrissas – que pode ser considerado um indicativo de agorafobia (do-Rego JC *et al.*, 2006)), e o vazio nas bordas do braço aberto (falta de referencial). Na caixa claro-escuro o principal estímulo aversivo é uma luz forte no compartimento claro, que é mais aversivo para animais albinos (o que não é o caso de nossos camundongos). Como não são mobilizadas as mesmas fobias em ambos os testes, a ausência de correlação entre os resultados do presente trabalho fortalece a visão multidimensional da ansiedade. Isso reforça a idéia de que para se identificar com exatidão uma alteração comportamental desse tipo, mais de um teste deve ser empregado (do-Rego JC *et al.*, 2006), o que não é muito comum nos trabalhos científicos.

No teste de nado forçado observou-se uma redução na imobilidade dos animais tratados com a nandrolona. Este teste foi idealizado por Porsolt e col. em 1977 para a identificação do efeito antidepressivo de drogas. Uma droga com efeitos antidepressivos reduziria a imobilidade neste teste, da mesma forma que o resultado obtido com os animais tratados com a nandrolona. Entretanto, a influência dos esteróides anabolizantes em estados depressivos é controversa. Enquanto alguns trabalhos sugerem um aumento de comportamentos relacionados ao transtorno depressivo com o abuso dessa droga (Lefavi *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1990), trabalhos clássicos sugeriam o seu uso para o tratamento desse tipo de transtorno (Alschule & Tillotson, 1948). Considerando a hiperatividade motora observada no teste do campo-aberto, a redução da imobilidade no nado forçado pode ser influência de uma estimulação motora (como sugerido em Prickaerts *et al.*, 2006), e não necessariamente a expressão de um efeito antidepressivo do esteróide anabolizante. De fato, drogas estimulantes e anticolinérgicas podem reduzir a imobilidade no teste do nado forçado por uma estimulação indiscriminada da atividade

motora ao invés de resultar de um efeito antidepressivo, gerando falsos positivos (Alonso *et al.*, 1989).

Os camundongos que receberam o esteróide iniciaram o comportamento agressivo mais rapidamente no paradigma residente-intruso. Além disto, no tempo analisado, um maior número de animais desse grupo apresentou comportamentos agressivos, tais como mordidas, investidas laterais e monta. Tais parâmetros são um indicativo de aumento na agressividade dos camundongos (Chiavegatto *et al.*, 2001; Nelson & Chiavegatto, 2000), confirmando o efeito de esteróides anabolizantes sobre o aumento de comportamentos agressivos relatados em humanos (Pope *et al.*, 1996) e em roedores (Steenland *et al.*, 2005a; Kindlundh *et al.*, 2003; DeLeon *et al.*, 2002). Este tipo de agressividade reativa e impulsiva, também observado em indivíduos com uso abusivo de EAA (Hall *et al.*, 2005), está de acordo com um papel para os esteróides androgênicos em aumentar a sensibilidade do indivíduo aos estímulos externos e reduzir o limiar para respostas agressivas e de dominância frente a ameaças sociais (Breuer *et al.*, 2001; McGinnis *et al.*, 2002; Hermans *et al.*, 2008).

Os efeitos comportamentais obtidos por doses supra-fisiológicas de nandrolona, que coletivamente sugerem uma desinibição comportamental, poderiam ser parcialmente explicados por distúrbios na neurotransmissão serotoninérgica.

Os EAA têm diferentes efeitos determinados pela localização e tipo celular. Estes efeitos são mediados pela ligação do hormônio a uma proteína intracelular, com a subsequente translocação desse complexo a sítios de ligação na cromatina para modular a transcrição gênica e síntese de RNAm (Spelsberg *et al.*, 1989). Nós não identificamos nenhum elemento responsivo a esteróides nos genes codificantes de 5-HTT, Tph2 ou de receptores que pudessem indicar um efeito direto desses elementos em suas

transcrições. Dessa maneira, nós sugerimos uma modulação indireta dos EAA na transcrição de genes relacionados à neurotransmissão serotoninérgica.

2- Expressão dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico

Os axônios serotoninérgicos se originam dos corpos celulares neuronais localizados nos núcleos dorsal e medial da rafé no mesencéfalo e se projetam para as regiões caudais e rostrais do cérebro (Aghajanian *et al.*, 1967; Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1991). Nós selecionamos diversas áreas cerebrais relacionadas aos comportamentos emocionais que são ricas em receptores de 5-HT. O RNAm isolado de cada região cerebral dissecada é basicamente derivado dos corpos neuronais de células que expressam os genes correspondentes, portanto, os transcritos de 5-HT obtidos das regiões anteriores do cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e hipotálamo) consistem tipicamente de receptores serotoninérgicos pós-sinápticos, provenientes de neurônios não serotoninérgicos. Dessa maneira, espera-se que os transcritos de 5-HT obtidos do mesencéfalo sejam basicamente derivados de corpos celulares serotoninérgicos, entretanto, a presença de neurônios não serotoninérgicos derivados de circuitos locais não pode ser excluída.

A análise da expressão gênica de transcritos referentes aos receptores serotoninérgicos em diferentes áreas cerebrais de camundongos recebendo nandrolona prolongadamente revelou diversas alterações peculiares a cada região analisada.

2.1- Amígdala

Sugere-se que a hiperexcitabilidade da amígdala contribua parcialmente às bases neurais envolvidas nos distúrbios de medo e ansiedade, controle de impulso e comportamentos agressivos (Davidson *et al.*, 2000; Keele, 2005; Coccaro *et al.*, 2007;

Nelson & Trainor, 2007). Altas doses de nandrolona administradas por 2 semanas em porquinhos da Índia aumentaram o número de neurônios positivos para c-FOS na amígdala central, demonstrando a ativação dessa área pelo EAA (Johansson-Steensland *et al.*, 2002). Em nosso estudo, a administração prolongada de nandrolona induziu uma redução significativa e extensa (com diminuições de 37 a 66%) de todos os transcritos de 5-HT analisados na amígdala, exceto pelo 5-HT_{3A}. Indo de acordo aos nossos resultados, uma redução dos receptores 5-HT₂ foi observada na amígdala de ratos machos através de estudos de ligação após o tratamento com altas doses de nandrolona (Kindlundh *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que a 5-HT ativa interneurônios GABAérgicos inibitórios na amígdala, exercendo um tônus inibitório generalizado na excitabilidade neuronal (Rainnie, 1999), o que sugere que a 5-HT funcione como um mecanismo de freio que limita a excitabilidade neuronal (Keele, 2005). Existe a possibilidade de que o efeito inibitório da nandrolona sobre o sistema serotoninérgico possa contribuir para uma maior excitabilidade da amígdala, que por sua vez poderia ser responsável pelas respostas comportamentais observadas no uso prolongado de EAA. Nesse sentido, foi demonstrado recentemente que a exposição a altas doses de EAA em ratos machos durante a puberdade aumentou a densidade de espinhas em neurônios localizados na região da amígdala, sugerindo um aumento das sinapses excitatórias nessas áreas (Cunningham *et al.*, 2007). Deve-se observar que a única família de receptores ionotrópicos de 5-HT, a família 5-HT₃, e que medeiam respostas excitatórias rápidas, foi o subtipo de receptores cujos transcritos não foram alterados pela nandrolona em nosso estudo.

2.2- Córtex pré-frontal

Estudos de lesões e imagens relacionam o córtex pré-frontal a desinibições comportamentais, atividade generalizada, atenção e emoção (Fuster, 2001). A administração prolongada de nandrolona ativa o córtex pré-frontal em porquinhos da Índia (Johansson-Steensland *et al.*, 2002). No presente estudo, a nandrolona induziu uma diminuição substancial na quantidade de RNAm dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT₇ (de 42 a 63% de diminuição) no córtex pré-frontal. Em concordância com nossos resultados, a densidade dos receptores 5-HT₂ apresentou-se significativamente diminuída no córtex frontal de ratos machos recebendo doses similares de nandrolona por 2 semanas (Kindlundh *et al.*, 2003).

Descobertas recentes de nosso laboratório têm demonstrado que o comportamento de agressividade exacerbada induzido por diferentes tipos de estímulos está relacionado a um perfil similar de redução na quantidade de transcrito da maioria dos receptores de 5-HT, particularmente na região do córtex pré-frontal. Enquanto que camundongos machos com agressividade e hiperatividade induzidas por isolamento social mostraram uma redução generalizada na expressão dos genes dos receptores de 5-HT no córtex pré-frontal (Bibancos *et al.*, 2007), camundongos exibindo comportamento agressivo exacerbado após o consumo de álcool mostraram uma diminuição na transcrição de todos os receptores de 5-HT investigados nesta região, com exceção do subtipo 3A (Chiavegatto *et al.*, 2007). Coletivamente, esses dados sugerem uma forte correlação entre o comportamento agressivo e perturbações na transcrição dos genes de receptores de 5-HT no córtex pré-frontal.

2.3- Hipocampo e Hipotálamo

A administração prolongada de nandrolona induziu um padrão similar de regulação do receptor 5-HT_{1B} tanto no hipocampo quanto no hipotálamo, com redução na quantidade de transcrito de 37 e 52% respectivamente. Em ambas as áreas, o subtipo 1B foi o único cuja expressão do gene se mostrou alterada. Altas doses de nandrolona também induziram uma redução marcante na densidade do receptor 5-HT_{1B} na região CA1 do hipocampo de roedores em um estudo prévio (Kindlundh *et al.*, 2003).

Nossos resultados, conjuntamente às reduções observadas na transcrição de 5-HT_{1B} na amígdala e no córtex pré-frontal, sugerem uma importante participação do subtipo 1B no fenótipo comportamental induzido pela administração de EAA.

Como a maioria dos transcritos de 5-HT obtidos de todas as áreas cerebrais mencionadas até o momento são derivadas de heteroreceptores de 5-HT, ou seja, receptores encontrados em neurônios não serotoninérgicos, nossos resultados indicam a participação do receptor 5-HT_{1B} pós-sináptico na desinibição comportamental encontrada. Concordando com esses resultados, impulsividade e comportamentos agressivos são encontrados em camundongos mutantes nulos para o gene do receptor 5-HT_{1B} (Saudou *et al.*, 1994), e diferentes agonistas para esse receptor reduzem ou abolem o comportamento agressivo em roedores (Fish *et al.*, 1999; Chiavegatto *et al.*, 2001; de Almeida *et al.*, 2006;). Adicionalmente, tem sido postulado que o heteroreceptor pós-sináptico 5-HT_{1B} influencia diretamente as vias de execução e consumação do comportamento agonístico (Olivier & van Oorschot, 2005).

Embora o receptor 5-HT_{1B} tenha sido o único afetado pela nandrolona no hipocampo, concentrações significativamente maiores de RNAm do receptor 5-HT₆ foram encontradas no hipotálamo. A função exata deste receptor não é totalmente conhecida, sendo que trabalhos correlacionais e de co-localização sugerem sua

participação em processos ansiosos e afetivos, de memória e aprendizado (Rogers & Hagan, 2001; Thomas & Hagan, 2004; Woolley *et al.*, 2004). Embora estudos investigando sua função sejam recentes, encontrou-se uma relação entre sua inibição e uma desinibição do sistema GABAérgico (Woolley *et al.*, 2004). Assim, o aumento de transcritos do receptor 5-HT₆ observado no hipotálamo em nosso trabalho poderia sugerir uma participação na inibição do sistema GABAérgico local, contribuindo assim ao fenótipo tipicamente ansioso encontrado em nossos animais.

2.4- Mesencéfalo

Todos os transcritos de 5-HT investigados no mesencéfalo foram quantitativamente similares nos camundongos de ambos os grupos. A enzima de síntese de 5-HT, seu transportador e os autoreceptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} são parte da maquinaria modulatória dos neurônios serotoninérgicos que funcionam como um mecanismo de *feedback* para controlar a atividade de 5-HT. A ausência de alterações na expressão desses genes nos neurônios serotoninérgicos indica que o efeito transcricional da nandrolona na neurotransmissão serotoninérgica parece ocorrer exclusivamente ao nível pós-sináptico.

Conclusão

Os camundongos que receberam a administração prolongada de decanoato de nandrolona demonstraram hiperatividade motora e aumento de comportamentos tipicamente ansiosos em ambientes novos, além de aumento na massa corporal, provavelmente devido às propriedades anabólicas do esteróide. E principalmente, eles foram mais agressivos e mais impulsivos para iniciar o ataque no paradigma do residente-intruso. A amígdala e o córtex pré-frontal foram as áreas onde a expressão dos genes relacionados a 5-HT foram mais afetados. Uma diminuição abrangente e significativa dos transcritos dos subtipos de receptores de 5-HT pode sugerir uma diminuição na inibição da atividade neuronal mediada pelo sistema serotoninérgico nessas duas áreas cerebrais, criticamente envolvidas na modulação de comportamentos emocionais, levando à desinibição comportamental observada.

Este distúrbio nos transcritos dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico não foi observado em áreas pré-sinápticas, isto é, onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos. A diminuição da expressão do gene do receptor 5-HT_{1B} nas quarto regiões cerebrais pós-sinápticas analisadas reforça a hipótese de envolvimento dos heteroreceptores de 5-HT_{1B} no comportamento agressivo e impulsivo.

Embora não possamos excluir a possibilidade de um efeito pós-transcricional da nandrolona ou diferentes ações modulatórias ao nível protéico da mesma sobre a neurotransmissão serotoninérgica, nossas descobertas em camundongos confirmam os efeitos colaterais psiquiátricos apontados em humanos usuários abusivos de EAA e vêm ainda contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares que medeiam esses efeitos adversos.

- ANEXO I –

**Parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa**



APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0390/07, intitulado: **EFITOS DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DO ESTERÓIDE ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA EM COMPORTAMENTO EMOCIONAIS E NA EXPRESSÃO GÊNICA EM DIFERENTES ÁREAS CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS**, apresentado pelo Departamento de PSQUIATRIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Silvana Chiavegatto**

Pesquisador (a) Executante: **Guilherme Ambar**

CAPPesq, 30 de maio de 2007


PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Recebido: 05/06/07 às 9h12
Departamento de Psiquiatria de FMUSP

Referências bibliográficas

- Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F. **Strategies for producing faster acting antidepressants.** Drug Discov Today. 2005; 10(8): 578-585.
- Aghajanian GK, Marek GJ. *Serotonin and hallucinogens.* Neuropsychopharmacology. 1999; 21(21): 16-23.
- Alschule MD & Tillotson KJ. **The use of testosterone in the treatment of depression.** N Engl J Med. 1948; 239: 1036-1038
- Arvary D, Pope HG Jr. **Anabolic-androgenic steroids as a gateway to opioid dependence.** N Engl J Med. 2000; 342(20): 1532.
- Ballenger JC. **Clinical guidelines for establishing remission in patients with depression and anxiety.** J Clin Psychiatry. 1999; 60(22): 29-34.
- Bahrke MS, Wright JE, O'Connor JS, Strauss RH, Catlin DH. **Selected psychological characteristics of anabolic-androgenic steroid users.** N Engl J Med. 1990; 323(12): 834-835.
- Bahrke MS, Wright JE, Strauss RH., Catlin DH. **Psychological moods and subjectively perceived behavioral and somatic changes accompanying anabolic-androgenic steroid use.** The American Journal of Sports Medicine. 1992; 20(6): 717-724.
- Barnes NM, Sharp T. **A review of central 5-HT receptors and their function.** Neuropharmacology. 1999; 38(8): 1083-152.
- Bennett AJ, Lesch KP, Heils A, Long JC, Lorenz JG, Shoaf SE, Champoux M, Suomi SJ, Linnoila MV, Higley JD. **Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function.** Mol Psychiatry. 2002; 7(1): 118-122.
- Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP. **Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors.** Trends Pharmacol Sci. 2005; 26(12): 625-630.
- Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ, Casaburi R. **Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal.** J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(2): 407-413.

- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. **Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice.** *Mol Pharmacol.* 1998; 53(4): 649-655.
- Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S. **Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice.** *Genes Brain Behav.* 2007; 6(6): 529-539.
- Blair RJ, Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Dolan RJ. **Dissociable neural responses to facial expressions of sadness and anger.** *Brain.* 1999; 122(5): 883-893.
- Bonasera SJ, Tecott LH. **Mouse models of serotonin receptor function: toward a genetic dissection of serotonin systems.** *Pharmacol Ther.* 2000; 88(2): 133-142.
- Bourson A, Boess FG, Bos M, Sleight AJ. **Involvement of 5-HT₆ receptors in nigrostriatal function in rodents.** *Br J Pharmacol.* 1998; 125(7): 1562-1566.
- Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. **Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation.** *Horm Behav.* 2001; 40(3): 409-418.
- Brower KJ. **Anabolic steroids.** *Psychiatr Clin North Am.* 1993; 16(1): 97-103.
- Buchel C, Morris J, Dolan RJ, Friston KJ. **Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study.** *Neuron.* 1998; 20(5): 947-957.
- Burnett KF & Kleiman ME. **Psychological characteristics of adolescent steroid users.** *Adolescence.* 1994; 29(113): 81-89.
- Catlin DH. **Use and abuse of anabolic steroids.** In: De Groot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology.* Philadelphia: Saunders. 2001; 2232-2242.
- CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas psicotrópicas) http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/lev_domiciliar2005/index.htm
- Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. **Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(3): 1277-1281.
- Chiavegatto S, Quadros IMH, Trindade A, Ambar G, Miczek KA. **Selective reduction of prefrontal cortex serotonin receptors gene expression in alcohol-heightened aggressive mice.** *Soc Neurosci Abstr.* 2007; 33: 531-524.
- Choi PYL, Parrott AC, Cowan D. **High-dose anabolic steroids in strength athletes: effects upon hostility and aggression.** *Hum Psychopharmacol.* 1990; 5: 349-356.

- Clark AS & Fast AS. **Comparison of the effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrostenolone, and nandrolone decanoate on the sexual behavior of castrated male rats.** Behav Neurosci. 1996; 110(6): 1478–1486.
- Clark AS & Henderson LP. **Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids.** Neurosci Biobehav Rev. 2003; 27(5): 413-436.
- Clark AS, Costine BA, Jones BL, Kelton-Rehkopf MC, Meerts SH, Nutbrown-Greene LL, Penatti CA, Porter DM, Yang P, Henderson LP. **Sex- and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions.** Brain Res. 2006; 1126(1): 122-138.
- Coccaro EF, McCloskey MS, Fitzgerald DA, Phan KL. **Amygdala and orbitofrontal reactivity to social threat in individuals with impulsive aggression.** Biol Psychiatry. 2007; 62(2): 168-178.
- Conacher GN & Workman DG. **Violent crime possibly associated with anabolic steroid use.** Am J Psychiatry. 1989; 146(5): 679.
- Conway AJ, Handelsman DJ, Lording DW, Stuckey B, Zajac JD. **Use, misuse and abuse of androgens. The Endocrine Society of Australia consensus guidelines for androgen prescribing.** Med J Aust. 2000; 172(5): 220- 224.
- Coon H, Dunn D, Lainhart J, Miller J, Hamil C, Battaglia A, Tancredi R, Leppert MF, Weiss R, McMahon W. **Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2).** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005; 135(1): 42-46.
- Cornea-Hebert V, Watkins KC, Roth BL, Kroeze WK, Gaudreau P, Leclerc N, Descarries L. **Similar ultrastructural distribution of the 5-HT(2A) serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat.** Neuroscience. 2002; 113(1): 23-35.
- Côté F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J, Vodjdani G. **Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(23): 13525-13530.
- Cowart VS. **Ethical, as well as physiological, questions continue to arise over athletes' steroid abuse.** JAMA. 1989; 261(23): 3362-3367.
- Crawley J & Goodwin FK. **Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.** Pharmacol Biochem Behav. 1980; 13(2): 167-170.

- Cunningham RL, Claiborne BJ, McGinnis MY. **Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats.** *Neuroscience*. 2007; 150(3): 609-615.
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL. **Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence.** *Science*. 2000; 289(5479): 591-594.
- de Almeida RM, Miczek KA. **Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement ("frustration") in mice: inhibition by anpirtoline: a 5-HT1B receptor agonist.** *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(2): 171-181.
- de Almeida RM, Rosa MM, Santos DM, Saft DM, Benini Q, Miczek KA. **5-HT(1B) receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice.** *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 185(4): 441-450.
- de Angelis L. **5-HT2A antagonists in psychiatric disorders.** *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3(1): 106-112.
- DeFries JC & Weir MW. **Open-field behavior of C57BL/6J mice as a function of age, experience, and prenatal maternal stress.** *Psychonomic Science*. 1964; 1: 389-390.
- DeLeon KR, Grimes JM, Melloni RH Jr. **Repeated Anabolic-Androgenic Steroid Treatment during Adolescence Increases Vasopressin V1A Receptor Binding in Syrian Hamsters: Correlation with Offensive Aggression.** *Hormones and Behavior*. 2002; 42(2): 182-191.
- De Rose EH & Nóbrega ACL. **Drogas lícitas e ilícitas.** In: Ghorayeb N, Barros TO. *Exercício*. São Paulo: Atheneu. 1999; 395-405.
- do-Rego JC, Viana AF, Le Maître E, Deniel A, Rates SM, Leroux-Nicollet I, Costentin J. **Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice.** *Behav Brain Res*. 2006; 169(2): 282-288.
- Dobs AS. **Is there a role for androgenic anabolic steroids in medical practice?** *JAMA*. 1999; 281(14): 1326-1327.
- Doucet E, Pohl M, Fattaccini CM, Adrien J, Mestikawy SE, Hamon M. **In situ hybridization evidence for the synthesis of 5-HT1B receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain.** *Synapse*. 1995; 19(1): 18-28.
- Du L, Faludi G, Palkovits M, Bakish D, Hrdina PD. **Serotonergic genes and suicidality.** *Crisis*. 2001; 22(2): 54-60.
- Durant RH, Ashworth CS, Newman C, Rickert VI. **Stability of the relationships between anabolic steroid use and multiple substance use among adolescents.** *J Adolesc Health*. 1994; 15(2): 111-116.

- Engel LL, Alexander J, Wheeler M. **Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone.** J Biol Chem. 1958; 231(1): 159-164.
- English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. **Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.** Circulation. 2000; 102(16): 1906-1911.
- Fenichel GM, Griggs RC, Kissel J, Kramer TI, Mendell JR, Moxley RT, Pestronk A, Sheng K, Florence J, King WM, Pandya S, Robison VD, Wang H. **A randomized efficacy and safety trial of oxandrolone in the treatment of Duchenne dystrophy.** Neurology. 2001; 56(8): 1075-1079.
- Feighner JP, Boyer WF. **Serotonin-1A anxiolytics: an overview.** Psychopathology. 1989; 22(1) :21-26.
- Fischer SG, Ricci LA, Melloni RH Jr. **Repeated anabolic/androgenic steroid exposure during adolescence alters phosphate-activated glutaminase and glutamate receptor 1 (GluR1) subunit immunoreactivity in Hamster brain: correlation with offensive aggression.** Behav Brain Res. 2007; 180(1): 77-85.
- Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA. **Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT(1B) receptor agonist CP-94,253.** Psychopharmacology (Berl). 1999; 146(4): 391-399.
- Freeman AM 3rd, Westphal JR, Norris GT, Roggero BA, Webb PB, Freeman KL, Rush JA, Hearne EM 3rd, Evoniuk G. **Efficacy of ondansetron in the treatment of generalized anxiety disorder.** Depress Anxiety. 1997; 5(3): 140-141.
- Fuster JM. **The prefrontal cortex--an update: time is of the essence.** Neuron 2001; 30(2): 319-333.
- Gingrich JA, Hen R. **Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice.** Psychopharmacology (Berl). 2001; 155(1): 1–10.
- Gobert A, Rivet JM, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, Nicolas JP, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ. **Serotonin(2C) receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat.** Synapse. 2000; 36(3): 205-221.
- Goodman WK. **Obsessive-compulsive disorder: diagnosis and treatment.** J Clin Psychiatry. 1999; 60(18): 27-32.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. **Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression.** Pharmacol Biochem Behav. 1996; 54(1): 129-141.
- Graeff FG. **On serotonin and experimental anxiety.** Psychopharmacology (Berl). 2002; 163(3-4): 467-476.

- Greenberg BD, Li Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J, Lesch KP, Hamer D, Murphy DL. **Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample.** *Am J Med Genet.* 2000; 96(2): 202-216.
- Grimes JM, Melloni RH Jr. **Serotonin modulates offensive attack in adolescent anabolic steroid-treated hamsters.** *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73(3): 713-721.
- Grimes JM, Melloni RH Jr. **Serotonin 1B receptor activity and expression modulate the aggression-stimulating effects of adolescent anabolic steroid exposure in hamsters.** *Behav Neurosci.* 2005; 119(5): 1184-1194.
- Grimes JM, Ricci LA, Melloni RH Jr. **Plasticity in anterior hypothalamic vasopressin correlates with aggression during anabolic/androgenic steroid withdrawal in hamsters.** *Behav Neurosci.* 2006; 120(1): 115-124.
- Grinspoon S, Corcoran C, Parlman K, Costello M, Rosenthal D, Anderson E, Stanley T, Schoenfeld D, Burrows B, Hayden D, Basgoz N, Klibanski A. **Effects of testosterone and progressive resistance training in eugonadal men with AIDS wasting: a randomized, controlled trial.** *Ann Intern Med.* 2000; 133(5): 348-355.
- Hallberg M, Johansson P, Kindlundh AM, Nyberg F. **Anabolic-androgenic steroids affect the content of substance P and substance P(1-7) in the rat brain.** *Peptides.* 2000; 21(6): 845-852.
- Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, Egan MF, Weinberger DR. **Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala.** *Science.* 2002; 297(5580): 400-403.
- Harrison RJ, Connor DF, Nowak C, Nash K, Melloni Jr RH. **Chronic anabolic-androgenic steroid treatment during adolescence increases anterior hypothalamic vasopressin and aggression in intact hamsters.** *Psychoneuroendocrinology.* 2000; 25(4): 317-338.
- Harvey M, Shink E, Tremblay M, Gagné B, Raymond C, Labbé M, Walther DJ, Bader M, Barden N. **Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders.** *Mol Psychiatry.* 2004; 9(11): 980-981.
- Hedlund PB, Sutcliffe JG. **Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research.** *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(9): 481-486.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. **Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(25): 15049-15054.

- Hensler JG, Ferry RC, Labow DM, Kovachich GB, Frazer A. **Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus.** *Synapse*. 1994; 17(1): 1-15.
- Holmes A. **Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice.** *Neurosci Biobehav Rev*. 2001; 25(3): 261–273.
- Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN. **Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter.** *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(6): 914-923.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. **Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.** *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 71(4):533-554.
- Iriart, JAB & Andrade, TM. **Body-building, steroid use, and risk perception among young body-builders from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil.** *Cad Saúde Pública*. 2002; 18(5): 1379-1387.
- Irwin W, Davidson RJ, Lowe MJ, Mock BJ, Sorenson JA, Turski PA. **Human amygdala activation detected with echo-planar functional magnetic resonance imaging.** *Neuroreport*. 1996; 7(11): 1765-1769.
- Janssen PA, Nicholls TL, Kumar RA, Stefanakis H, Spidel AL, Simpson EM. **Of mice and men: will the intersection of social science and genetics create new approaches for intimate partner violence?** *J Interpers Violence*. 2005; 20(1): 61-71.
- Ji SP, Zhang Y, Van Cleemput J, Jiang W, Liao M, Li L, Wan Q, Backstrom JR, Zhang X. **Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse.** *Nat Med*. 2006; 12(3): 324-329.
- Johansen KL, Mulligan K, Schambelan M. **Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis: a randomized controlled trial.** *JAMA*. 1999; 281(14): 1275-1281.
- Johansson-Steensland P, Nyberg F, Chahl L. **The anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate, increases the density of Fos-like immunoreactive neurons in limbic regions of guinea-pig brain.** *Eur J Neurosci*. 2002; 15(3): 539-544.
- Julius D. **Serotonin receptor knockouts: a moody subject.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(26): 15153-15154.
- Keele NB. **The role of serotonin in impulsive and aggressive behaviors associated with epilepsy-like neuronal hyperexcitability in the amygdala.** *Epilepsy Behav*. 2005; 7(3): 325-335.

- Kelley SP, Bratt AM, Hodge CW. **Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice.** *Eur J Pharmacol.* 2003; 461(1): 19-25.
- Kindlundh A, Isacson D, Berglund L, Nyberg F. **Factors associated with adolescent use of doping agents: anabolic-androgenic steroids.** *Addiction.* 1999; 94(4): 543–553.
- Kindlundh AM, Lindblom J, Bergstrom L, Wikberg JE, Nyberg F. **The anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate affects the density of dopamine receptors in the male rat brain.** *Eur J Neurosci.* 2001; 13(2): 291-296.
- Kindlundh AM, Lindblom J, Bergstrom L, Nyberg F. **The anabolic-androgenic steroid nandrolone induces alterations in the density of serotonergic 5HT_{1B} and 5HT₂ receptors in the male rat brain.** *Neuroscience.* 2003; 119(1): 113-120.
- King JA, Tenney J, Rossi V, Colamussi L, Burdick S. **Neural substrates underlying impulsivity.** *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1008: 160-169.
- Kroeze WK, Roth BL. **The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis.** *Biol Psychiatry.* 1998; 44(11): 1128-1142.
- Labar KS, Gatenby JC, Gore JC, Ledoux JE, Phelps EA. **Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study.** *Neuron.* 1998; 20(5): 937-945.
- Lanfumeey L & Hamon M. **5-HT₁ receptors.** *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004, 3(1): 1–10.
- Lappalainen J, Long JC, Eggert M, Ozaki N, Robin RW, Brown GL, Naukkarinen H, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D. **Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT_{1B} receptor gene in 2 populations.** *Arch Gen Psychiatry.* 1998; 55(11): 989–994
- Lefavi RG, Reeve TG, Newland MC. **Relationship between anabolic steroid use and selected psychological parameters in male bodybuilders.** *J Sport Behav.* 1990; 13: 157-166.
- Lesch KP & Mossner R. **Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders?** *Biol Psychiatry.* 1998; 44 (3): 179–192.
- Lesch KP. **Mouse anxiety: the power of knockout.** *Pharmacogenomics J.* 2001; 1(3): 187-192.

- Li Q, Wichems C, Heils A, Van De Kar LD, Lesch KP, Murphy DL. **Reduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT)(1A)-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT(1A) binding sites in 5-HT transporter knockout mice.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291(3): 999-1007.
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA. **Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice.** *Biol Psychiatry.* 2003; 54(10): 960-971.
- Lister RG. **The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 92(2): 180-185.
- Mann GE. **The role of luteal oxytocin in episodic secretion of prostaglandin F2alpha at luteolysis in the ewe.** *Anim Reprod Sci.* 1999; 57(3-4): 167-175.
- Marlier L, Teilhac JR, Cerruti C, Privat A. **Autoradiographic mapping of 5-HT1, 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptors in the rat spinal cord.** *Brain Res.* 1991; 550(1): 15-23.
- Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM. **Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression.** *J Neurosci Methods.* 2004; 140(1-2): 169-181.
- Mazer CD, Greene MB, Misale PS, Newman D, Dorian P. **Transcutaneous T wave shock: a universal method for ventricular fibrillation induction.** *Pacing Clin Electrophysiol.* 1997; 20(12 Pt 1): 2930-2935.
- McIntyre KL, Porter DM, Henderson LP. **Anabolic androgenic steroids induce age-, sex-, and dose-dependent changes in GABA(A) receptor subunit mRNAs in the mouse forebrain.** *Neuropharmacology.* 2002; 43(4): 634-645.
- Menard J & Treit D. **Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety.** *Neurosci Biobehav Rev.* 1999; 23(4): 591-613.
- Miczek KA, Faccidomo S, de Almeida RM, Bannai M, Fish EW, Debold JF. **Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities.** *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1036: 336-355.
- Midgley SJ, Heather N, Davies JB. **Levels of aggression among a group of anabolic-androgenic steroid users.** *Med Sci Law.* 2001; 41(4): 309-314.
- Miner LA, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR. **Ultrastructural localization of serotonin2A receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex.** *Neuroscience.* 2003; 116(1): 107-117.

- Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. **Biological actions of androgens.** *Endocr Rev.* 1987; 8(1): 1-28.
- Morley-Fletcher S, Darnaudéry M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S. **Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampalcorticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats.** *Neuropharmacology.* 2004; 47(6): 841-847.
- Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, Dolan RJ. **A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions.** *Nature.* 1996; 383(6603): 812-815.
- National Institute on Drug Abuse. <http://www.nida.nih.gov/>
- Nelson RJ & Chiavegatto S. **Aggression in knockout mice.** *Inst Lab Anim Res J.* 2000; 41(3): 153–162
- Nelson RJ & Chiavegatto S. **Molecular basis of aggression.** *Trends in Neurosc.* 2001; 24(12): 713-719.
- Nelson RJ, Trainor BC. **Neural mechanisms of aggression.** *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8(7): 536-546.
- Nolan KA, Volavka J, Lachman HM, Saito T. **An association between a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene and aggression in schizophrenia and schizoaffective disorder.** *Psychiatr Genet.* 2000; 10(3): 109-115.
- Nonogaki K, Strack AM, Dallman MF, Tecott LH. **Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene.** *Nat Med.* 1998; 4(10): 1152-1156.
- Olivier B, Herremans A, Mos J, van Drimmelen M, Tulp M, van Oorschot R, Hijzen T. **Discriminative stimulus properties of eltoprazine in the pigeon.** *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 64(2): 421-427.
- Olivier B. **Serotonin and aggression.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1036: 382–392.
- Olivier B & van Oorschot R. **5-HT_{1B} receptors and aggression: a review.** *Eur J Pharmacol.* 2005; 526(1-3): 207-217.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. **Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(18): 10734-10739.

- Pazos A & Palacios JM. **Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain.I. Serotonin-1 receptors.** Brain Res. 1985; 346(2): 205-230.
- Perry PJ, Yates WR, Andersen KH. **Psychiatric symptoms associated with anabolic steroids: a controlled, retrospective study.** Ann Clin Psychiatry. 1990; 2: 11-17.
- Pope HG Jr & Katz DL. **Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use.** Am J Psychiatry. 1988; 145(4): 487-490.
- Pope HG Jr & Katz DL. **Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes.** Arch Gen Psychiatry. 1994; 51(5): 375-382.
- Pope HG Jr, Kouri EM, Powell KF, Campbell C, Katz DL. **Anabolic-Androgenic Steroid Use Among 133 Prisoners.** Compr Psychiatry. 1996; 37(5): 322-327.
- Porsolt R, LePichon M, Jalfre M. **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** Nature. 1977; 266(5604): 730-732.
- Prickaerts J, Moechars D, Cryns K, Lenaerts I, van Craenendonck H, Goris I, Daneels G, Bouwknecht JA, Steckler T. **Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania.** J Neurosci. 2006; 26(35): 9022-9029
- Rainnie DG. **Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala.** J Neurophysiol. 1999; 82(1): 69-85.
- Ramboz S, Saudou F, Amara DA, Belzung C, Segu L, Misslin R, Buhot MC, Hen R. **5-HT1B receptor knock out--behavioral consequences.** Behav Brain Res. 1996; 73(1-2): 305-312.
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. **Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(24): 14476-14481.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. **Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain.** J Comp Neurol. 2000, 417(2): 181-194
- Ricci LA, Rasakham K, Grimes JM, Melloni RH. **Serotonin-1A receptor activity and expression modulate adolescent anabolic/androgenic steroid-induced aggression in hamsters.** Pharmacol Biochem Behav. 2006; 85(1): 1-11
- Rogers DC & Hagan JJ. **5-HT6 receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat.** Psychopharmacology (Berl). 2001; 158(2): 114-119.

- Rosenfeld RG, Frane J, Attie KM. **Six-years results of a randomized prospective trial of human growth hormone and oxandrolone in Turner syndrome.** J Pediatr. 1992; 121(21): 49-55.
- Sari Y, Lefevre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Verge D. **Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT1B receptors in the rat brain.** Brain Res. 1997; 760(1-2): 281–286
- Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R. **Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor.** Science. 1994; 265(5180): 1875-1878.
- Schneier FR, Garfinkel R, Kennedy B, Campeas R, Fallon B, Marshall R, O'Donnell L, Hogan T, Liebowitz MR. **Ondansetron in the treatment of panic disorder.** Anxiety. 1996; 2(4): 199-202.
- Schroor EJ, Weissenbruch MM, Knibbe P, Waal HAD. **The effect of prolonged administration of an anabolic steroid (oxandrolone) on growth in boys with constitutionally delayed growth and puberty.** Eur J Pediatr. 1995; 154(12): 953-957.
- Schulte HM, Hall MJ, Boyer M. **Domestic violence associated with anabolic steroid abuse.** Am J Psychiatry. 1993; 150(2): 348.
- Shahidi NT. **A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids.** Clinical Therapeutics 2001; 23(9): 1355-1390.
- Shinkai T, Ohmori O, Suzuki T, Kojima H, Hori H, Terao T, Nakamura J. **Polymorphisms of tryptophan hydroxylase gene and the symptomatology of schizophrenia: an association study.** Psychiatr Genet. 2000; 10(4): 165-171.
- Spelsberg TC, Rories C, Rejman JJ, Goldberger A, Fink K, Lau CK, Colvard DS, Wiseman G. **Steroid action on gene expression: possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites.** Biol Reprod. 1989; 40(1): 54-69.
- Steensland P, Hallberg M, Kindlundh A, Fahlke C, Nyberg F. **Amphetamine-induced aggression is enhanced in rats pre-treated with the anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate.** Steroids. 2005; 70(3): 199-204.
- Steensland P, Blakely G, Nyberg F, Fahlke C, Pohorecky LA. **Anabolic androgenic steroid affects social aggression and fear-related behaviors in male pair-housed rats.** Horm Behav. 2005a; 48(2): 216-224.
- Su T, Pagliaro M, Schmidt PJ, Pickar D, Wolkowitz O, Rubinow DR. **Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers.** JAMA. 1993; 269(21): 2760-2764.

- Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D. **Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors.** *Nature*. 1995; 374(6522): 542-546.
- Thiblin I, Finn A, Ross SB, Stenfors C. **Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids.** *Br J Pharmacol*. 1999; 126(6): 1301-1306.
- Thomas DR & Hagan JJ. **5-HT₇ receptors.** *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004; 3(1): 81-90.
- Trouillas P. **Regression of cerebellar syndrome with long-term administration of 5-HTP or the combination 5-HTP-benserazide.** *Ital J Neurol Sci*. 1984; 5(3): 253-266.
- van de Kar LD. **Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1991; 31: 289-320
- Vandesompele J, Katleen DP, Filip P, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology*. 2002; 3(7): 34.1-34.11.
- Volavka J, Bilder R, Nolan K. **Catecholamines and aggression: The role of COMT and MAO polymorphisms.** *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1036: 393-398.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. **Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform.** *Science*. 2003; 299(5603): 76.
- Walther DJ & Bader M. **A unique central tryptophan hydroxylase isoform.** *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(9): 1673-1680.
- Whalen PJ, Rauch SL, Etcoff NL, Mcinerney SC, Lee MB, Jenike MA. **Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge.** *J Neurosci*. 1998; 18(1): 411-418.
- Whitaker-Azmitia P, Zhou F, Hobin J, Borella A. **Isolation-rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus.** *Peptides*. 2000; 21(11): 1755-1759.
- Wolf H. **Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists.** *Scand J Rheumatol Suppl*. 2000; 113: 37-45.
- Woolley ML, Marsden CA, Fone KC. **5-HT₆ receptors.** *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004; 3(1): 59-79
- Wu FC. **Endocrine aspects of anabolic steroids.** *Clin Chem*. 1997; 43(7): 1289-1292.

- Yang P, Jones BL, Henderson LP. **Mechanisms of anabolic androgenic steroid modulation of alpha(1)beta(3)gamma(2L) GABA(A) receptors.** *Neuropharmacology*. 2002; 43(4): 619-633.
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. **Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis.** *Science*. 2004; 305(5681): 217.
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Eser D, Rupprecht R, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M. **SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression.** *Mol Psychiatry*. 2004a; 9(11): 1030-1036.
- Zill P, Buttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M. **Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims.** *Biol Psychiatry*. 2004b; 56(8): 581-586.
- Zill P, Buttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Ackenheil M, Bondy B. **Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study.** *J Psychiatr Res*. 2007; 41(1-2): 168-173.