

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
SBFis/UFRRJ**

DISSERTAÇÃO

**Programação paterna com propionato de testosterona
e seus impactos sobre a prole de camundongos**

Raphael da Silva Lau

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS SBFis/UFRRJ**

**PROGRAMAÇÃO PATERNA COM PROPIONATO DE
TESTOSTERONA E SEUS IMPACTOS SOBRE A PROLE DE
CAMUNDONGOS**

RAPHAEL DA SILVA LAU

Sob a Orientação do Professor
Wellington da Silva Côrtes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ

Outubro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d366p da Silva Lau, Raphael, 1992-
Programação paterna com propionato de testosterona
e seus impactos sobre a prole de camundongos /
Raphael da Silva Lau. - Seropédica, 2022.
154 f.: il.

Orientador: Wellington da Silva Côrtes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, 2022.

1. Programação paterna. 2. esteroide androgênico
anabolizante. 3. ansiedade. 4. memória. 5.
sociabilidade. I. da Silva Côrtes, Wellington, 1964-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação Multicêntrico em
Ciências Fisiológicas III. Título.



TERMONº 1072/2022 - DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Nº do Protocolo: 23083.063886/2022-49

Seropédica-RJ, 13 de outubro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

RAPHAEL DA SILVA LAU

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/10/2022

Banca Examinadora: **Titulares:**

Dr Wellington da Silva Côrtes (Orientador – UFRRJ)

Dra Fabiana Cardoso Vilela Giusti (Membro Externo- UNIFAL)

Dr Fábio Fagundes da Rocha (Membro Interno – UFRRJ)

Dr Luis Carlos Reis (Membro Intemo – UFRRJ)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 14/10/2022 08:37)

FABIO FAGUNDES DA ROCHA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: 1519567

(Assinado digitalmente em 15/10/2022 22:32)

LUIS CARLOS REIS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: 387295

(Assinado digitalmente em 13/10/2022 16:51)

WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: 386960

(Assinado digitalmente em 13/10/2022 14:55)

FABIANA CARDOSO VILELA GIUSTI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 068.040.286-19

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida, me possibilitando saúde, força e proteção para seguir em frente todos os dias.

À minha família pela educação que me deram, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, por mais que esta decisão fizesse me ausentar da presença de todos em alguns momentos. Tudo vai valer à pena!

Aos meus amigos mais próximos, aos que se afastaram, pela contribuição na minha formação como ser humano ao longo desta caminhada da vida. Com certeza, a troca de experiência e momentos com cada um foi extremamente importante para chegar aqui.

Ao meu orientador, mestre, chefe (no melhor da palavra), amigo, Wellington da Silva Côrtes, por ser muito mais do que um simples orientador para todos à sua volta. Sua bondade, paciência e amizade torna nossa caminhada mais leve. Agradeço por todas as nossas conversas, brincadeiras e ensinamentos ao longo desses anos.

Ao grande amigo, coorientador, conselheiro, Roberto Laureano, por contribuir tanto na minha formação, que vai muito além da vida acadêmica. Como você fala: as pessoas que a gente mais convive, acabam exercendo grande influência no nosso caráter e é verdade. Obrigado, mestrão!

À Lívia Monteiro, Isabella e a professora Norma pela grande ajuda na realização e na interpretação dos resultados do RT-qPCR.

Ao amigo Vitor Pereira por estar sempre disposto a ajudar nas tarefas do laboratório, mesmo com todas as dificuldades apresentadas na sua vida atualmente.

Ao Alojamento Masculino de Pós-Graduação por proporcionar um ambiente para morar e conviver com tantas pessoas diferentes. Nossos momentos de festas, futebol no campo da Ecologia, reuniões e mutirões são momentos que fazem parte desse período que guardo com carinho.

Aos meus alunos de personal e que confiam no meu trabalho, pois me deram tranquilidade para terminar o mestrado, mesmo após o fim da bolsa. Sem isso, teria sido impossível.

Ao Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento por todo o conhecimento desenvolvido com o grupo.

Ao Departamento de Ciência Fisiológicas pela disponibilidade logística para a realização deste trabalho.

À UFRRJ por me proporcionar tantos momentos marcantes na minha vida. A vivência da graduação que me possibilitou uma carreira à fim de almejar um futuro melhor. A pesquisa por me ensinar a não desistir na primeira "diferença não significativa". À extensão por ter me dado tantas oportunidades de crescimento pessoal que me tornaram ainda mais crítico nas minhas escolhas e decisões.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela formação oferecida durante esses dois anos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), assim como da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) através dos editais E-12/2019 e E-05/2020.

RESUMO

Lau, RS. **Programação paterna com propionato de testosterona e seus impactos sobre a prole de camundongos**. 2022. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022)

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são substâncias que compreendem a testosterona e substâncias quimicamente derivadas dela, sendo amplamente utilizada para fins estéticos e recreacionais. A maioria das pesquisas envolvendo a transmissão da herança genética/epigenética esteve, principalmente, focado nos insultos endócrinos e nutricionais de origem materna, e pouca ou nenhuma atenção foi dada aos insultos de origem paterna e sua possível relação no estabelecimento de herança na sua descendência. Dessa forma, nosso objetivo foi verificar se a exposição paterna a uma dose supra-fisiológica de propionato de testosterona é capaz de alterar os parâmetros comportamentais da prole de camundongos Swiss durante a idade adulta, bem como os mecanismos transcricionais envolvidos. Para esse propósito, foram utilizados no protocolo 1, 10 camundongos machos, divididos em grupo controle (n=5) e grupo tratado (n=5) que foram administrados com 7,5 mg/kg de PT, duas vezes por semana, durante 5 semanas. Ao final do protocolo, os animais foram colocados em acasalamento. Após a prole completar 70 dias de vida, foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais composta por: campo aberto (CA), reconhecimento de objetos 6 horas (RO 6h), caixa claro-escuro (CCE), labirinto em cruz elevado (LCE) e suspensão pela cauda (SC). Ao final da realização dos métodos comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo o hipocampo dissecado para a análise dos seguintes genes através de RT-qPCR: *Gabra2*, *Gad1*, *Bdnf*, *Ntrk2*, *Tph2*, *Htr1a* e *Th*. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student ou Mann-Whitney e as médias foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$. Em relação aos achados comportamentais, foi verificado um aumento dos comportamentos análogos à ansiedade na prole de machos (M) e fêmeas (F). Nos machos foi observado pela diminuição de permanência no lado claro na CCE ($p = 0,002$) ($\downarrow 60,3\%$), assim como nos braços abertos do LCE ($p=0,04$) ($\downarrow 26,8\%$) e aumento de permanência nos braços fechados ($p=0,01$) ($\uparrow 47,1\%$), enquanto nas fêmeas foi observado aumento do número de bolos fecais no teste do CA ($p=0,013$) ($\uparrow 81,1\%$) e aumento no número de posturas de avaliação de risco (SAP) no LCE ($p=0,01$) ($\uparrow 109,4\%$). Além disso, tanto os machos, quanto as fêmeas reduziram o tempo de imobilidade no teste de SC, ($p = 0,02$) ($\downarrow 28\%$) e ($p=0,04$) ($\downarrow 33,1\%$), respectivamente. Já no teste de RO 6h, apenas as fêmeas demonstraram déficits na memória mnemônica, visualizado pelo parâmetro de discriminação relativa (D2) ($\downarrow 9,5\%$). Por sua vez, apenas os machos apresentaram alteração na expressão de genes no hipocampo, como aumento da expressão de *Gabra2* ($p=0,04$) ($\uparrow 42,8\%$) e redução da expressão de *Gad1* ($p=0,02$) ($\downarrow 17\%$). Para a realização do protocolo 2, foram utilizados 59 animais machos para a formação dos grupos controle (n=28) e tratado (n=31), que foram administrados com PT, utilizando o mesmo tratamento do protocolo 1. Desse total de animais, foi realizada uma nova distribuição de modo que uma parte fosse submetida a bateria de testes comportamentais logo ao final do tratamento (controle=23, tratado=25), enquanto uma outra parte foi colocada em acasalamento (controle=5, tratado=6). Os testes comportamentais realizados nesta etapa com os animais submetidos ao tratamento com PT foram: CA, RO 6h, CCE, LCE, interação social (IS), SC e intruso residente (IR). Não foram verificadas alterações nos comportamentos análogos à ansiedade. Por sua vez, foi observado que o tratamento reduziu o tempo de discriminação absoluto (D1) ($p=0,01$) ($\downarrow 40,1\%$), assim como os

índices de discriminação absoluto (D2) ($p=0,004$) ($\downarrow 38,2\%$) e o índice de discriminação relativo (D3) ($p=0,03$) ($\downarrow 14,1\%$). Além disso, houve redução do engajamento social com um coespecífico, observado no teste de interação social, observado pela redução do índice de sociabilidade ($p=0,03$) ($\downarrow 8,3\%$). Os pais tratados com PT também tiveram aumento dos comportamentos agressivos, observado a partir da diminuição da latência para o 1º ataque ($p=0,0001$) ($\downarrow 67\%$), assim como o aumento do nº de ataques ($p=0,014$) ($\uparrow 83,8\%$) e tempo de luta (boxing) ($p=0,0001$) ($\uparrow 138,5\%$). Por fim, houve redução do índice testicular ($p=0,01$) ($\downarrow 29,6\%$), sem alterações da massa corporal, assim como nos níveis plasmáticos de testosterona, avaliado por método do ELISA. Por sua vez, a prole M e F da linhagem paterna que foi submetida ao tratamento e, posteriormente, ao acasalamento, foi avaliada aos 70 dias de vida em métodos de avaliação comportamental complementar ao realizado no protocolo 1 e foi composto por: RO 24h, Labirinto de Barnes (LB), esquiva passiva (EP), IS, IR. Foi observado que a prole de camundongos machos tiveram um déficit de memória 24h após a exposição ao objeto familiar, observado pela redução do D1 ($p=0,003$) ($\downarrow 87,7\%$), D2 ($p=0,02$) ($\downarrow 90,5\%$) e D3 ($p=0,02$) ($\downarrow 19\%$). Além disso, houve redução do engajamento social com um coespecífico, observado no teste de interação social, com redução do índice de sociabilidade ($p=0,02$) ($\downarrow 24,4\%$). O mesmo resultado foi encontrado na prole de camundongos fêmeas com redução do índice de interação social ($p=0,046$), assim como o índice de preferência social ($p=0,02$) ($\downarrow 17,5\%$). Não foram verificadas diferenças significativas nos testes LB, EP e IR. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a programação paterna com PT foi capaz de promover alterações comportamentais e neuroquímicas de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, demonstrando aumento dos comportamentos análogos à ansiedade, um déficit na memória, assim como uma redução no engajamento social, indicando um determinado grau de ansiedade social na prole na fase adulta.

Palavras chaves: esteroides androgênicos anabolizantes, programação paterna, ansiedade, memória, sociabilidade

ABSTRACT

Lau, RS. **Paternal programming with Testosterone Propionate and its Impacts on Mice Offspring**. 2022. 154 p. Dissertation (Master in Physiological Sciences). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022)

Anabolic androgenic steroids (AAS) are substances that comprise testosterone and substances chemically derived from it, being widely used for aesthetic and recreational purposes. Most research involving the transmission of genetic/epigenetic inheritance has mainly focused on endocrine and nutritional insults of maternal origin, and little or no attention has been given to insults of paternal origin and their possible relationship to the establishment of inheritance in their offspring. Thus, our objective was to verify whether paternal exposure to a supraphysiological dose of testosterone propionate is capable of altering the behavioral parameters of the offspring of Swiss mice during adulthood, as well as the transcriptional mechanisms involved. For this purpose, 10 male mice were used in protocol 1, divided into a control group (n=5) and a treated group (n=5) that were administered with 7.5 mg/kg of PT, twice a week, during 5 weeks. At the end of the protocol, the animals were placed in mating. After the offspring reached 70 days of life, they were submitted to a battery of behavioral tests consisting of: open field (AC), object recognition 6 hours (RO 6h), light-dark box (CCE), elevated plus maze (LCE)) and tail suspension (SC). At the end of the behavioral methods, the animals were euthanized, and the hippocampus was dissected for the analysis of the following genes through RT-qPCR: *Gabra2*, *Gad1*, *Bdnf*, *Ntrk2*, *Tph2*, *Htr1a* and *Th*. Statistical analysis was performed using Student's t test or Mann-Whitney test and means were considered different when $p < 0.05$. Regarding the behavioral findings, an increase in anxiety-like behaviors was observed in the offspring of males (M) and females (F). In males, it was observed a decrease in permanence on the light side in the OHC ($p = 0.002$) ($\downarrow 60.3\%$), as well as in the open arms of the ECL ($p=0.04$) ($\downarrow 26.8\%$) and an increase in permanence in closed arms ($p=0.01$) ($\uparrow 47.1\%$), while in females it was observed an increase in the number of fecal boluses in the CA test ($p=0.013$) ($\uparrow 81.1\%$) and an increase in the number of risk assessment postures (SAP) in the LCE ($p=0.01$) ($\uparrow 109.4\%$). Furthermore, both males and females reduced immobility time in the SC test, ($p = 0.02$) ($\downarrow 28\%$) and ($p=0.04$) ($\downarrow 33.1\%$), respectively. In the OR 6h test, only females showed deficits in mnemonic memory, visualized by the relative discrimination parameter (D2) ($\downarrow 9.5\%$). In turn, only males showed alterations in gene expression in the hippocampus, such as increased expression of *Gabra2* ($p=0.04$) ($\uparrow 42.8\%$) and reduced expression of *Gad1* ($p=0.02$) ($\downarrow 17\%$). For protocol 2, 59 male animals were used to form the control (n=28) and treated (n=31) groups, which were administered with PT, using the same treatment as protocol 1. Of this total number of animals, a new distribution was performed so that one part was submitted to a battery of behavioral tests right at the end of the treatment (control=23, treated=25), while another part was placed in mating (control=5, treated=6). The behavioral tests performed at this stage with the animals submitted to PT treatment were: CA, RO 6h, CCE, LCE, social interaction (IS), SC and resident intruder (IR). There were no changes in anxiety-like behaviors. In turn, it was observed that the treatment reduced the absolute discrimination time (D1) ($p=0.01$) ($\downarrow 40.1\%$), as well as the absolute discrimination indexes (D2) ($p=0.004$) ($\downarrow 38.2\%$) and the relative discrimination index (D3) ($p=0.03$) ($\downarrow 14.1\%$). In addition, there was a reduction in social engagement with a conspecific, observed in the social interaction test, observed by the reduction in the sociability index

($p=0.03$) ($\downarrow 8.3\%$). Parents treated with PT also had an increase in aggressive behavior, observed from the decrease in latency to the 1st attack ($p=0.0001$) ($\downarrow 67\%$), as well as the increase in the number of attacks ($p=0.014$) ($\uparrow 83.8\%$) and fighting time (boxing) ($p=0.0001$) ($\uparrow 138.5\%$). Finally, there was a reduction in the testicular index ($p=0.01$) ($\downarrow 29.6\%$), without changes in body mass, as well as in plasma testosterone levels, evaluated by the ELISA method. In turn, the M and F offspring of the paternal lineage that were submitted to treatment and, later, to mating, were evaluated at 70 days of age using behavioral assessment methods complementary to those performed in protocol 1 and were composed of: RO 24h, Barnes Maze (LB), Passive Dodge (EP), IS, IR. It was observed that the offspring of male mice had a memory deficit 24h after exposure to the familiar object, observed by the reduction of D1 ($p=0.003$) ($\downarrow 87.7\%$), D2 ($p=0.02$) ($\downarrow 90.5\%$) and D3 ($p=0.02$) ($\downarrow 19\%$). In addition, there was a reduction in social engagement with a conspecific, observed in the social interaction test, with a reduction in the sociability index ($p=0.02$) ($\downarrow 24.4\%$). The same result was found in the offspring of female mice with a reduction in the social interaction index ($p=0.046$), as well as the social preference index ($p=0.02$) ($\downarrow 17.5\%$). There were no significant differences in the LB, EP and IR tests. Thus, our results suggest that paternal programming with PT was able to promote behavioral and neurochemical changes in brain systems involved with affective responses, demonstrating an increase in anxiety-like behaviors, a deficit in memory, as well as a reduction in social engagement, indicating a certain degree of social anxiety in the adult offspring.

Keywords: anabolic androgenic steroids, parental programming, anxiety, memory, sociability

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-gônada	5
Figura 02: Biossíntese da testosterona.....	7
Figura 03: Estrutura química do propionato de testosterona	10
Figura 04: Regiões encefálicas envolvidas na circuitaria de agressão em camundongos	20
Figura 05: Cromatina e modificações epigenéticas do DNA e histonas	24
Figura 06: Tipos de herança entre as gerações	27
Figura 07: Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo 1 ...	31
Fig. 08: Bateria de métodos comportamentais da prole F e M	32
Figura 09: Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo 2	32
Figura 10: Bateria de métodos de avaliação comportamental dos pais submetidos ao tratamento com PT (F0)	33
Figura 11: Métodos comportamentais da prole F e M.....	34
Figura 12: Aparato do teste de campo aberto	36
Figura 13: Aparato do teste de labirinto em cruz elevado	37
Figura 14: Aparato do Teste da caixa claro-escuro	38
Figura 15: Aparato do Teste de suspensão pela cauda.....	39
Figura 16: Aparato do Teste de interação social.....	42
Figura 17: Aparato do Teste de reconhecimento de objetos.....	43
Figura 18: Aparato do Teste do Labirinto de Barnes.....	46
Figura 19: Aparato do Teste de esquiva-passiva.....	47
Figura 20: Esquema do método de dosagem de testosterona por ELISA.....	49
Figura 21: Formato da placa de amostras	50
Figura 22: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de campo aberto (prole M)	54
Figura 23: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro	55
Figura 24: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado.....	55

Figura 25: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda	56
Figura 26: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos 6h (prole M)	56
Figura 27: Avaliação da expressão dos genes <i>Tph2</i> , <i>Hrt1a</i> e <i>Th</i> relacionados ao sistema serotoninérgico e monoaminérgico	57
Figura 28: Avaliação da expressão de <i>Bdnf</i> e <i>Ntrk2</i>	57
Figura 29: Avaliação da expressão de genes <i>Gad1</i> e <i>Gabra2</i> relacionados ao sistema gabaérgico.....	58
Figura 30: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de campo aberto (prole F).....	58
Figura 31: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro	59
Figura 32: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado.....	59
Figura 33: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda	60
Figura 34: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos 6h	60
Figura 35: Avaliação da expressão dos genes <i>Tph2</i> , <i>Hrt1a</i> e <i>Th</i> relacionados ao sistema serotoninérgico e monoaminérgico	61
Figura 36: Avaliação da expressão de <i>Bdnf</i> e <i>Ntrk2</i>	61
Figura 37: Avaliação da expressão de genes <i>Gad1</i> e <i>Gabra2</i> relacionados ao sistema gabaérgico.....	62
Figura 38: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de campo aberto (pai)	62
Figura 39: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro	63
Figura 40: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado.....	63
Figura 41: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda	64

Figura 42: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos – 6h.....	64
Figura 43: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de interação social na etapa de Sociabilidade	65
Figura 44: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de interação social na etapa de Preferência Social	66
Figura 45: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste Intruso Residente.....	67
Figura 46: Avaliação da evolução da massa corporal nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo	68
Figura 47: Avaliação da massa testicular e do índice testicular nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo.....	68
Figura 48: Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo	69
Figura 49: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos 24h (prole M).....	69
Figura 50: Linha temporal de aprendizado referente a latência no teste Labirinto de Barnes	70
Figura 51: Linha temporal de aquisição e retenção de memória no teste esquiva-passiva	71
Figura 52: Avaliação de tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de interação social	72
Figura 53: Avaliação de tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Preferência Social do teste de interação social	73
Figura 54: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste intruso residente	74
Figura 55: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos 24h (prole F).....	74
Figura 56: Linha temporal de aprendizado referente a latência no teste Labirinto de Barnes	75
Figura 57: Linha temporal de aquisição e retenção de memória no teste esquiva-passiva	76
Figura 58: Avaliação de tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de interação social	77

Figura 59: Avaliação de tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Preferência Social do teste de interação social 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação dos Transtornos de ansiedade segundo a Associação de Psiquiatria norte-americana.....	14
Tabela 02: Fórmulas utilizadas na avaliação da tarefa de reconhecimento de objetos	44
Tabela 03: Sequência dos pares de primers utilizados	52
Tabela 04: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de interação social (pais MACHOS)	65
Tabela 05: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Preferência Social do teste de interação social (pais MACHOS)	66
Tabela 06: Resultados da ANOVA Two-Way referentes a evolução da massa corporal nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo.....	68
Tabela 07: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao período de treinamento para aquisição de memória no teste Labirinto de Barnes (prole M).....	70
Tabela 08: Resultados da ANOVA Two-Way referentes aos dias de aquisição e retenção de memória do teste esquiva-passiva (prole M).....	71
Tabela 09: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de interação social (prole M).....	72
Tabela 10: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Preferência Social do teste de interação social (prole M)	73
Tabela 11: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao período de treinamento para aquisição de memória no teste de Labirinto de Barnes (prole F).....	75
Tabela 12: Resultados da ANOVA Two-Way referentes aos dias de aquisição e retenção de memória do teste esquiva-passiva (prole F)	76
Tabela 13: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de interação social (prole F).....	77

Tabela 14: Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Preferência Social do teste de interação social (prole F) 78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo dos resultados dos testes comportamentais nos camundongos machos submetidos ao tratamento com propionato de testosterona.....	79
Quadro 2. Resumo dos resultados dos testes comportamentais na prole M 7,5mg/kg	79
Quadro 3. Resumo dos resultados referentes à expressão de genes na prole M 7,5 mg/kg	80
Quadro 4. Resumo dos resultados dos testes comportamentais na prole F 7,5mg/kg	80
Quadro 5. Resumo dos resultados referentes à expressão de genes na prole F 7,5 mg/kg	81
Quadro 6. Quadro de referências	83
Quadro 7. Quadro de referências	86
Quadro 8. Quadro de referências	89
Quadro 9. Quadro de referências	93
Quadro 10. Quadro de referências	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

3 α -17 β -diol – 5 α -androstana-3 α -17 β -diol

3 β -17 β -diol – 5 α -androstana-3 β -17 β -diol

5-HT – 5-hidroxi-triptamina

5HT1a – Receptor 5H-hidroxitriptofano 1A

17 β HSD – 17 β -hidroxiesteróide

ABP – Proteína ligadora de andrógenos (*androgen binding protein*)

AIH – Autorização de Internação Hospitalar

Ame – Amígdala medial

Ampd – Amígdala medial pósterio-dorsal

APml – Área Pré-Óptica médio lateral

AVE – Acidente Vascular Encefálico

AVP – Arginina vasopressina central

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain derived neurotrophic factor*)

BM – Barnes Maze

BNST – Núcleo do leito da estria terminal

CA – Campo aberto

CBP – Globulina ligadora de corticosteróide (*corticosteroid-binding protein*)

CCA – Circuitaria central de agressividade

CCE – Caixa claro-escuro

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COI – Cômite Olímpico Internacional

D1 – Discriminação absoluta

D2 – Índice de discriminação absoluto

D3 – Discriminação relativa

DA – Dopamina

DAT – Transportador de Dopamina (*Dopamine transporter*)

DHEA – Deidroepiandrosterona (*dehydroepiandrosterone*)

DHT – Diidrotestosterona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase
EAA – Esteroide anabólico androgênico
EP – Esquiva-passiva
Er α – Receptor de estrogênio α
Er β – Receptor de estrogênio β
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GABA – Ácido γ aminobutírico
GAD – Ácido glutâmico descarboxilase
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
HA – Hipotálamo anterior
Área Cinzenta Periaquedutal (Periaqueductal Gray Area) – PGA
H-H-G – Hipotálamo-Hipófise-Gônada
HPLC – High Performance Líquid Cromatography
IR – Intruso residente
IS – Interação Social
LB – Labirinto de Barnes
LCE – Labirinto em cruz elevado
lcnRNA – RNA longo não-codificante
LH – Hormônio Luteinizante
mPFC – Córtex pré-frontal (medial Pre-Frontal Cortex)
mRNA – RNA mensageiro
MWMT – Morris Water Maze Test
NA – Noradrenalina
nAC – Núcleo Accumbens
NS – Estímulo não-social
qRT-PCR – Quantification real time reverse transcription polymerase chain reaction
pb – Pares de base
PCL – Período de crescimento lento
piRNA – PiwiRNA
PT – Propionato de Testosterona
RA – Receptor androgênico
REL – Retículo endoplasmático liso
RO – Reconhecimento de objetos

S – Estímulo social

SAP – *Stretched attention position*

SC – Suspensão pela cauda

SERT – Transportador de serotonina

SHBG – Proteína ligadora de hormônios sexuais (*sex hormone binding globulin*)

siRNA – Pequeno RNA de interferência

SL – Septo Lateral

SNC – Sistema nervoso central

snoRNA – RNA nucleolar

SRY – Região Determinante do sexo no cromossomo Y

SSRI – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors*)

T – Testosterona

TDF – Fator determinante testicular

TPH – Triptofano hidroxilase

VAT – Área Tegmental Ventral (*Ventral area tegmental*)

VMHvl – porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial

XiRNA – RNA de inativação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Fisiologia da testosterona.....	2
2.2 Fisiofarmacologia do Propionato de testosterona	9
2.3 Aspectos epidemiológicos do uso de esteroides anabólicos androgênicos	11
2.4 Transtornos de ansiedade, depressão e sua relação com a testosterona.....	13
2.5 Testosterona e agressividade.....	19
2.6 Epigenética e herança multigeracional.....	22
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Tratamento.....	30
4.3 Delineamento Experimental.....	30
4.4 Aspectos éticos	34
4.5 Métodos de avaliação comportamental.....	35
4.5.1 Ansiedade e depressão	35
4.5.1.1 Campo aberto (CA).....	35
4.5.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)	36
4.5.1.3 Caixa claro-escuro (CCE)	38
4.5.1.4 Suspensão pela cauda (SC).....	38
4.5.2 Agressividade (Intruso residente – IR)	40
4.5.3 Sociabilidade (Interação social – IS)	40
4.5.4 Memória	42
4.5.4.1 Reconhecimento de objetos.....	42
4.5.4.2 Labirinto de Barnes	44
4.5.4.3 Esquiva passiva	46
4.6 Eutanásia e coleta de materiais biológicos.....	48

4.7 Métodos de quantificação e biologia molecular	48
4.7.1 ELISA.....	48
4.7.2 Biologia Molecular	50
4.7.2.1 Extração de RNA.....	50
4.7.2.2 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR) 51	
4.8 Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS	54
5.1 Testes de ansiedade e depressão (Prole M) (Protocolo 1).....	54
5.1.1 Campo aberto	54
5.1.2 Caixa claro escuro	54
5.1.3 Labirinto em cruz elevado	55
5.1.4 Suspensão pela cauda.....	56
5.2 Memória (Reconhecimento de objetos - 6h)	56
5.3 Expressão gênica (prole M)	56
5.4 Testes de ansiedade e depressão (Prole F) – (Protocolo 1).....	58
5.4.1 Campo aberto	58
5.4.2 Caixa claro escuro.....	59
5.4.3 Labirinto em cruz elevado	59
5.4.4 Suspensão pela cauda.....	60
5.5 Memória (Reconhecimento de objetos 6h).....	60
5.6 Expressão gênica (prole F)	61
5.7 Testes de ansiedade e depressão (Pai) (Protocolo 2).....	62
5.7.1 Campo aberto	62
5.7.2 Caixa claro escuro	62
5.7.3 Labirinto em cruz elevado	63
5.7.4 Suspensão pela cauda.....	64
5.8 Memória (Reconhecimento de objetos - 6h)	64
5.9 Sociabilidade e preferência social	65
5.10 Agressividade (Intruso residente)	67
5.11 Massa corporal, índice testicular e níveis plasmáticos de PT.....	67
5.12 Memória (prole M)	69

5.12.1 Reconhecimento de objetos 24h.....	69
5.12.2 Labirinto de Barnes	69
5.12.3 Esquiva passiva	71
5.13 Sociabilidade e preferência social	71
5.14 Agressividade (Intruso residente)	73
5.15 Memória (prole F)	74
5.15.1 Reconhecimento de objetos 24h.....	74
5.15.2 Labirinto de Barnes	74
5.15.3 Esquiva passiva	75
5.16 Sociabilidade e preferência social	76
6 DISCUSSÃO	82
6.1 Massa Corporal e massa testicular.....	82
6.2 Parâmetros comportamentais (pai)	83
6.3 Parâmetros comportamentais e neurobiológicos (prole M e F).....	98
7 CONCLUSÕES.....	108
LIMITAÇÕES	108
FONTES DE FINANCIAMENTO	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são substâncias que compreendem a testosterona e substâncias quimicamente derivadas dela. Estas substâncias têm diversos usos terapêuticos, como na reposição hormonal em casos de hipogonadismo masculino. Como essas substâncias possuem um efeito anabólico caracterizado pelo aumento da síntese proteica (aumentando a massa muscular), pode-se observar que essas substâncias vêm contribuindo há décadas, em todo o mundo, para a melhoria de performance física e efeitos estéticos. Dessa forma, este tipo de substância, chamou a atenção de certos grupos da população, na qual vale destacar: adolescentes do sexo masculino, atletas de alto rendimento e atletas recreacionais, que começaram a fazer uso e aproveitar de seus efeitos farmacológicos.

Por sua vez, sabe-se que a interação do indivíduo com o ambiente é capaz de levá-lo a alterações que podem perdurar por toda a sua vida e, que por sua vez, podem ser transmitidos para sua descendência, através de mecanismos epigenéticos (metilação, modificação das histonas, micro RNAs não-codificantes, entre outros). Isso quer dizer que qualquer exposição a fatores ambientais como dieta, estilo de vida, exposição à radiação, poluentes, drogas de abuso, prática de exercícios físicos, entre outros, contribuem para as alterações no epigenoma do indivíduo. Nesse contexto, devido a capacidade de transmissão dessas alterações epigenéticas para a descendência, ocorre o risco de aparecimento de doenças na vida adulta. A Origem Fetal das Doenças, conhecida também como a Teoria de Barker, proposto pelo epidemiologista inglês David Barker, trata exatamente sobre esse período crítico de desenvolvimento fetal e suas possíveis implicações na idade adulta.

A maioria das pesquisas envolvendo a transmissão da herança genética/epigenética esteve, principalmente, focado nos insultos endócrinos e nutricionais de origem materna, e pouca ou nenhuma atenção foi dada aos insultos de origem paterna e sua possível relação no estabelecimento de herança na sua descendência. Dessa forma, torna-se importante entender como a utilização do uso de drogas de abuso, como os anabolizantes, pode influenciar a próxima geração, além de buscar contribuir para o desenvolvimento de novos estudos envolvendo as interações do ambiente paterno com sua descendência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia da testosterona

Grande parte das distinções entre homens e mulheres decorrem da interação dos cromossomos recebidos dos pais que contribuem para definir diversas características visualizadas no indivíduo. Sabe-se que os filhos recebem 23 cromossomos de origem materna e 23 de origem paterna. A diferenciação sexual fica por conta dos cromossomos X e Y. Dessa forma, denomina-se na genética que há 22 pares de cromossomos homólogos e dois cromossomos sexuais. As fêmeas são descritas com 2 cromossomos X, sendo um de cada genitor. Por sua vez, os machos recebem um cromossomo X da mãe, e um cromossomo Y que vem do pai. Portanto, o genótipo feminino é definido como XX e o masculino como genótipo XY. Dessa forma, é possível visualizar a grande importância do pai para a definição sexual da sua prole (BEAR et. al, 2017).

Através de mecanismos transcricionais e traducional, o organismo é capaz de sintetizar uma certa quantidade de hormônios sexuais, os quais são capazes de modular e alterar diversas estruturas fisiológicas (ex: diferenciação sexual), assim como influenciar o comportamento humano. No homem, a presença do gene conhecido como Região Determinante do sexo no cromossomo Y (SRY), localizado no braço curto do cromossomo Y, influenciará a produção do Fator Determinante Testicular (TDF), que é necessário para a transcrição de genes que contribuem para a diferenciação testicular. Esse processo de diferenciação é conhecido como sexo genético. Logo, o resultado desse processo influencia diretamente a definição do sexo gonadal, caracterizado pela presença de testículos ou ovários (NASSAR e LESLIE, 2018; YANAI et al, 2021).

Os órgãos sexuais masculinos e femininos (testículos e ovários, respectivamente) são importantes na homeostase reprodutiva e endócrina, contribuindo, por exemplo, na regulação dos níveis hormonais internos. São estruturas localizadas fora do sistema nervoso central (SNC), mas que são ativados por estruturas localizadas no encéfalo (BEAR et. al, 2017). Estruturas como o hipotálamo e a hipófise são as responsáveis por fazerem parte do controle endócrino de diversos tecidos-alvos, sendo assim, o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (H-H-G) é o responsável por exercer esse controle de síntese e liberação dos hormônios sexuais tanto masculinos quanto femininos. São os neurônios localizados no hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado e na área pré-óptica, os responsáveis por secretar o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (PLANT, 2015).

O GnRH é um decapeptídeo, que é liberado da eminência mediana e se difunde pelo sistema porta-hipofisário, atuando sobre a hipófise anterior (adeno-hipófise). Ao chegar às células especializadas localizados na adeno-hipófise, conhecido como gonadotrofos, consegue estimular a liberação de dois hormônios importantes para o controle do eixo H-H-G que são o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Como a maioria dos eixos neuroendócrinos, o eixo H-H-G é controlado, principalmente via feedback negativo, o que quer dizer que um aumento nas concentrações séricas de FSH e LH, assim como os produtos liberados pelos tecidos-alvos, causados pela ação do GnRH, contribuirá para a sua inibição (SILVA, DANIELSKI e CZEPIELEWSKI, 2002).

O eixo H-H-G é singular, pois apresenta um padrão de liberação pulsátil ao alcançar a puberdade mantendo-se na fase adulta, porém permanecem durante todo o período da infância em um estado de quiescência. Foi demonstrado que durante o período fetal a liberação de GnRH, contribuindo para as elevações hormonais ocorridas nas últimas semanas antes do nascimento, são essenciais, principalmente, para a reorganização nas regiões do encéfalo que controlam a reprodução (GLANOWSKA, BURGER e MOENTER, 2014). Porém, durante o período pré-púbere, as células somáticas gonadais, responsáveis por sustentar a gametogênese, apresentam-se incapazes de responder totalmente a estimulação realizada pelas gonadotrofinas. Embora a capacidade da gônada pré-puberal de responder à estimulação causada pela gonadotrofina seja adquirida durante a infância, a liberação pulsátil de GnRH continua suprimida, garantindo assim um estado de inatividade contínua da gônada, tanto em meninos quanto em meninas (PLANT, 2015). Por sua vez, ao alcançar a puberdade, a atividade gonadal é retomada (religamento) contribuindo para as vigorosas transformações que ocorrerão nesse período de transição da vida infantil para a vida adulta. Neste período, a liberação de GnRH se apresenta de maneira pulsátil ao longo do dia, sendo uma característica importante do eixo H-H-G, resultando em flutuações ultradianas das concentrações plasmáticas de gonadotrofinas (ACEVEDO-RODRIGUEZ, 2018).

A secreção de GnRH, por sua vez, podem ser moduladas pelo recebimento de algumas aferências sobre seus neurônios, dentre as quais, se destaca a transmissão kisspeptidérgica. Foi verificado que neurônios kisspeptidérgicos, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, se projetam diretamente para os corpos celulares e axônios dos neurônios GnRHérgicos. Ademais, neurocinina B e dinorfina, coexpressando com kisspeptina no núcleo arqueado, formam uma rede neuronal conhecida como kisspeptina-

neurocinina-dinorfina (neurônios KNDy) sendo, por sua vez, componentes vitais para a geração de pulsos para a liberação do GnRH (DIAS et al., 2015; PLANT, 2015). Além disso, outros estímulos sobre os neurônios GnRHérgicos contribuem também para a modulação da sua atividade intrínseca. Enquanto o estímulo sobre receptores alfa-adrenérgicos parece estimular a liberação de GnRH, a ativação dos receptores beta-adrenérgicos parece inibi-la. Ademais, a liberação de dopamina, assim como a administração de morfina, também contribui para a inibição da liberação de GnRH (AIRES, 2017). Foi visto também que neurônios CRHérgicos exercem função inibitória sobre sua liberação, o que parece ser plausível, visto que o estresse tem sido relacionado à diminuição da função reprodutiva (ACEVEDO-RODRIGUEZ, 2018). Além disso, as citocinas também parecem influenciar a liberação de GnRH, visto que a administração de interleucina-1 reduz a atividade dos neurônios GnRHérgicos. É importante destacar que as citocinas estão envolvidas na liberação de CRH, o que indiretamente contribui para a inibição da liberação de GnRH (AIRES, 2017). (**Figura 1**).

O FSH e o LH são glicoproteínas, com tamanho em torno de 33 e 28 kDa respectivamente, sintetizados pelas células gonadotróficas, que estão localizadas na adeno-hipófise, constituindo cerca de 10% das células adeno-hipofisárias. Após serem sintetizadas, os hormônios são transportados pela corrente sanguínea onde, por sua vez, atuam sobre as gônadas (KAPRARA e HUTTANIEMI, 2018). No homem, o FSH atua sobre as células de Sertoli, localizadas nos testículos, e tem como função estimular a espermatogênese, através de síntese e liberação. da proteína ligadora de andrógenos (*androgen binding protein* – ABP), que é secretada no interior dos túbulos seminíferos (local responsável pela produção das células reprodutoras masculinas), contribuindo para manter os níveis de testosterona elevados, necessários para o amadurecimento dos espermatozoides. Outra função importante do FSH é referente à síntese de inibinas, que é capaz de inibir a liberação do próprio FSH na hipófise, reduzindo seus níveis circulantes no sangue (DA SILVA, 2020). O LH, por sua vez, atua sobre as células de Leydig e tem como função principal estimular a síntese de testosterona (TES) (KAPRARA e HUTTANIEMI, 2018).

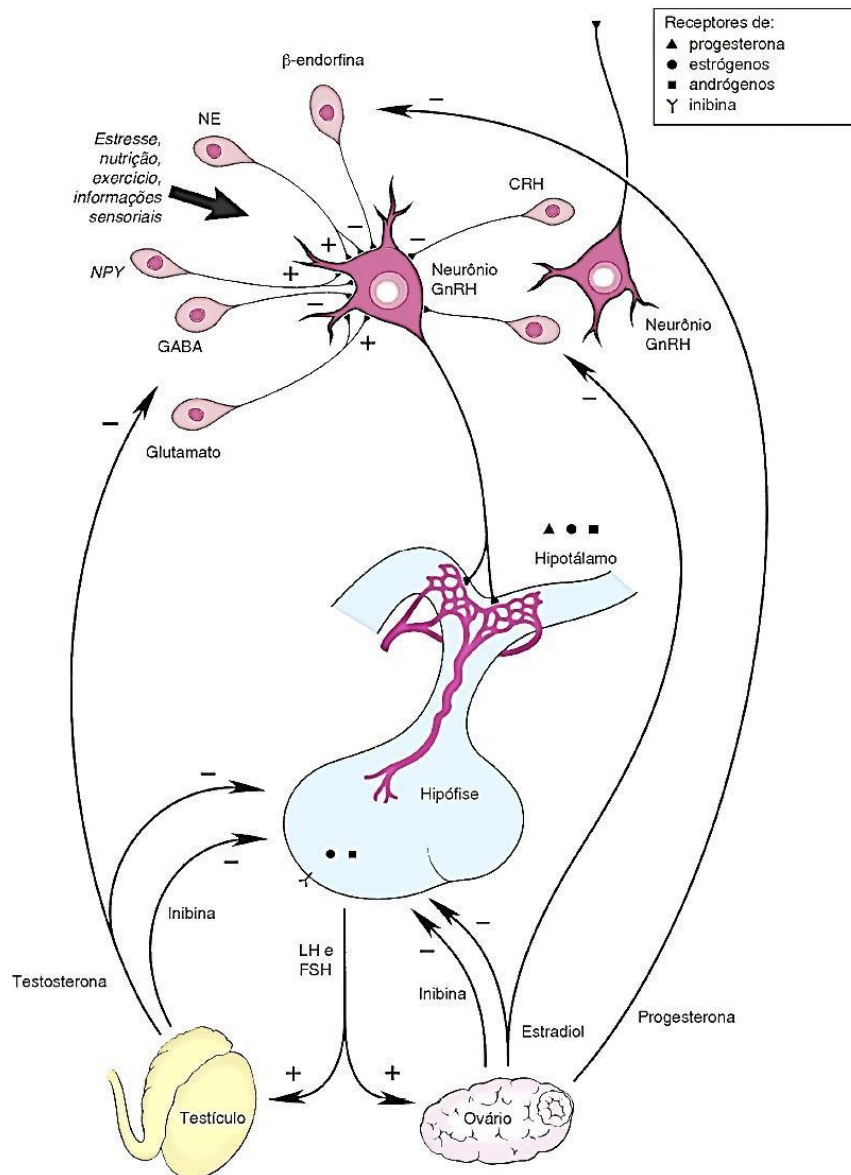


Figura 1. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Retirado do livro Margarida Aires 5ª edição.

Os androgênios são os hormônios capazes de promover e manter as características primárias e secundárias do homem, em que o mais abundante na circulação sanguínea é a TES (COSTA, 2004; CORRÊA, 2005). Para a formação dos androgênios, a fonte primária utilizada é o colesterol (ROCHA, 2014). As células de Leydig podem formar o colesterol a partir da Acetil-Coenzima A ou pode captar a lipoproteína de baixa densidade presente do líquido extracelular com auxílio de receptores (BORON, 2017). A formação da TES apresenta cinco etapas e ocorre nas células de Leydig, presentes entre os túbulos seminíferos, representando mais de 20% da massa dos testículos do homem adulto, e necessitam de algumas enzimas importantes que ajudam a catalisar todo o processo de formação (GUYTON e HALL, 2017). A formação da TES inicia-se na mitocôndria

transformando o acetato em colesterol. Posteriormente, o colesterol (27 átomos de carbono em sua composição) sofre ação da enzima 20,22 desmolase (p450_{scc}) que cliva a cadeia lateral de colesterol na posição 20. Esse passo é considerado limitante na formação de TES, pois é nesta etapa em que o colesterol é convertido em **pregnolona** (21 átomos de carbono). Isso parece ocorrer devido a ação do LH, que é o principal regulador da síntese de TES nas células de Leydig, na qual parece aumentar a afinidade da enzima 20,22 desmolase pelo colesterol, assim como aumenta a expressão desta enzima disponível para ação, o que pode ser chamado de estereidogênese. Posteriormente, a pregnolona será convertida em **17 α -hidroxipregmolona**, após sofrer ação da enzima 17 α -hidroxilase (p450_{c17}) no retículo endoplasmático liso (REL) e adicionar um grupamento hidroxil na posição 17. A 17 α -hidroxipregmolona, posteriormente, será convertida em uma molécula de 19 carbonos conhecida como **deidroepiandrosterona** (*dehydroepioandrosterone* – DHEA), após sofrer ação da 17,20 desmolase (p450_{c17} com ação modificada), que elimina de sua formação anterior a cadeia 17 de carbono (BORON, 2017). Ainda no REL da célula de Leydig, a molécula de DHEA será modificada ao sofrer ação da enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD, que não é um tipo de enzima p450), que converte a cetona da posição 17 em um grupamento hidroxil, formando, por sua vez, o **androstenediol**. A última etapa fica por conta da ação de uma enzima conhecida 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) que oxida o grupamento hidroxil da posição 3 do anel A em cetona, formando, finalmente, a **testosterona** (**Figura 2**).

O homem é capaz de produzir em torno de 5-9 mg de testosterona por dia, na qual, em sua grande maioria (em torno de 45%) encontra-se acoplada à proteína ligadora de hormônios sexuais (*sex hormone binding globulin* – SHBG), enquanto uma outra parcela encontra-se associada à albumina plasmática e a globulina ligadora de corticosteróide (*corticosteroid-binding proteín* – CBP). Apenas 2% de toda testosterona produzida está livre no plasma para exercer suas funções. Após ação da testosterona livre, novas moléculas de testosterona se desprendem das proteínas ligadoras para restabelecer o estoque utilizado (COSTANZO, 2014; FERREIRA, 2007).

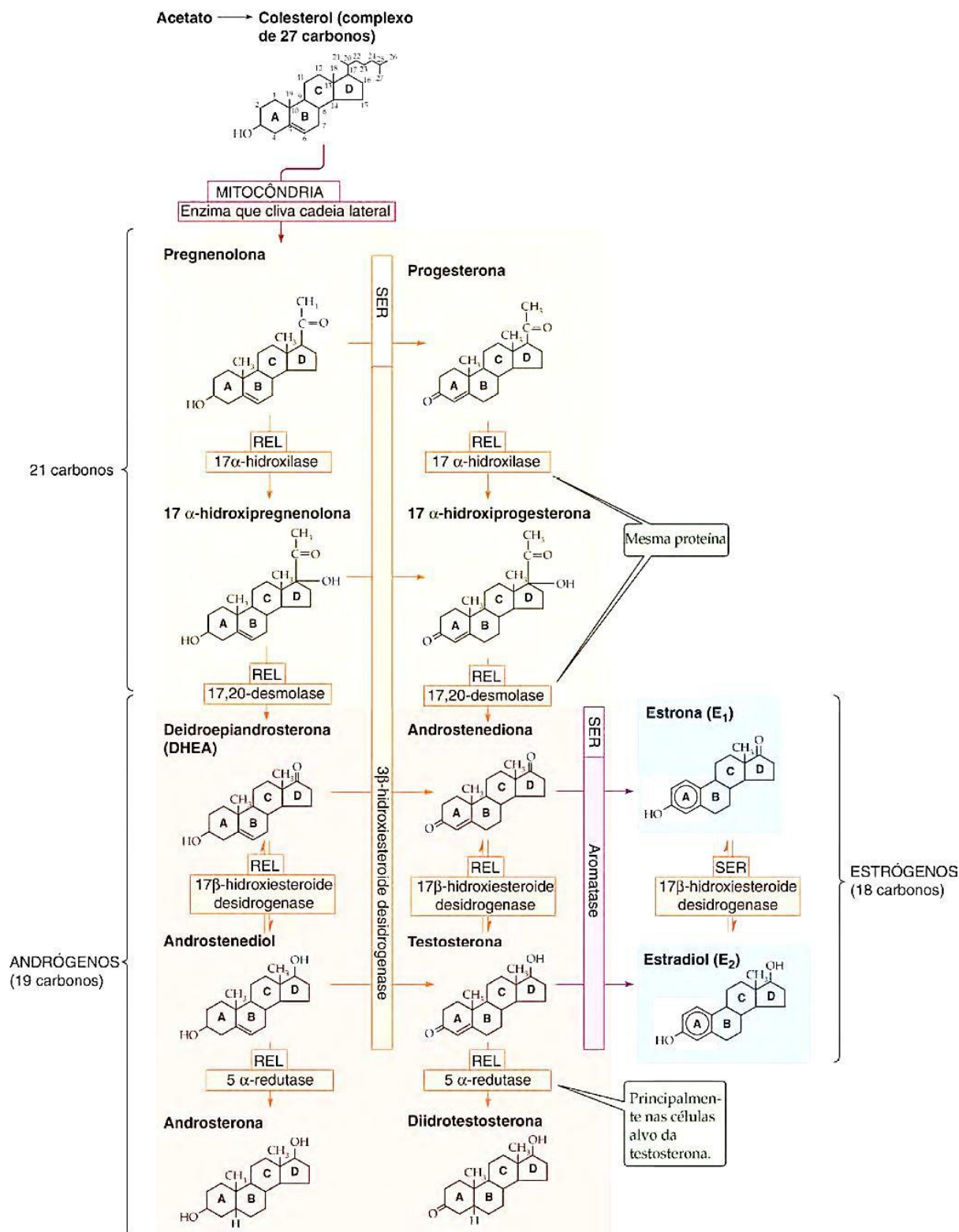


Figura 2. Biossíntese da Testosterona (retirado de BORON, 2017)

Os hormônios sexuais masculinos exercem sua função ao se ligar no receptor androgênico (RA), membro da família de receptores nucleares, clássica dos demais

receptores de esteroides. O RA é composto por 4 domínios distintos: um domínio N-terminal regulador da transcrição, um domínio de ligação ao DNA com os clássicos dedos de zinco proximal e distal, uma região “dobradiça” e um domínio de ligação ao andrógeno (CORRÊA, 2005), que se direciona posteriormente para o núcleo da célula, aumentando a transcrição de mRNA, e, levando conseqüentemente, a produção de novas proteínas, que é uma das funções mais observadas pelos androgênios (MOURA, 1984).

Apesar de a TES ser o hormônio de maior circulação no corpo, grande parte dela é convertida nos tecidos-alvo pela enzima 5 α -redutase no hormônio ativo diidrotestosterona (DHT). A DHT possui ação biológica androgênica maior do que a testosterona (KUHN, 2002). A DHT é responsável por diversas modificações visualizadas durante a puberdade, denominadas de características sexuais secundárias, tais como: por exemplo, o crescimento de pelos púbicos e axilares, crescimento da barba, maior ativação das glândulas sebáceas, crescimento da laringe com subsequente engrossamento da voz, aumento do pênis e dos testículos, aumento da massa muscular, entre outros (COSTA, 2004; DA SILVA, 2002; KATZUNG e TREVOR, 2017). A ação da DHT é intrácrina agindo, principalmente, sobre os tecidos que expressam a enzima 5 α -redutase, as quais expressam em concomitância a enzima 3 α -hidroxiesteroide desidrogenase (3 α -HSD), responsável por catalisar a reação reversível da DHT em 5 α -androstana-3 α -17 β -diol (androtenediol), um andrógeno de ação mais fraca. Por fim, a DHT é inativada no fígado pela enzima 3 α -HSD do tipo 2. A 5 α -androstana-3 α -17 β -diol, formada no fígado e nos tecidos periféricos, é conjugada no próprio fígado ao ácido glicurônico, formando, por sua vez, 5 α -androstana-3 α , 17 β -diol gluconada (3 α -diol G), que é eliminada pelos rins. As concentrações de 3 α -diol G, assim como a sua eliminação pelos rins, é um ótimo marcador para a presença a formação de DHT (CURI, 2009). Por sua vez, se a TES sofrer ação química da aromatase, a mesma será transformada em estradiol, inclusive no SNC, ligando-se, por sua vez, a receptores para estrógeno para exercer suas funções (BEAR et. al, 2002; COSTA, 2004; AIRES, 2017).

Devido aos seus efeitos anabólicos, os androgênios foram modificados quimicamente, de modo que se tornaram mais resistentes à degradação e tiveram seus efeitos mais prolongados, sendo utilizados outros fins, por exemplo, estéticos, além do uso terapêutico. Esses androgênios modificados receberam o nome de esteroides anabolizantes e contribuem para o aumento da síntese proteica e no desenvolvimento muscular (KUHN, 2002), tendo seu uso difundido entre alguns grupos da população.

Dessa forma, torna-se um importante aspecto epidemiológico o estudo dos efeitos dessas substâncias sobre os seus usuários.

2.2 Fisiofarmacologia do propionato de testosterona

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são substâncias que compreendem a testosterona e substâncias quimicamente derivadas dela (GRIMES et al. 2003; MPHIL et al. 2014). Estes compostos podem ser classificados quimicamente em três categorias: 1) Derivados da testosterona por reação de esterificação do grupo 17β hidroxil, tais como o propionato e o cipionato de testosterona; 2) Ésteres de testosterona que podem ser convertidos à testosterona ou estrógeno, tais como a nandrolona e a 19-nor-testosterona; 3) Compostos alquilados, tais como o stanozolol e a 17- α -metiltestosterona (OBLANDER et al. 2012). Estas substâncias têm diversos usos terapêuticos como na perda de massa muscular induzida por infecção por vírus da imunodeficiência humana, tratamento de distrofias musculares, falha de produção celular da medula óssea e crescimento infantil retardado (PIACENTINO et al. 2015), bem como, reposição hormonal em casos de hipogonadismo masculino (BARRETO-ESTRADA et al. 2004; BITRAN et al. 1993). Apesar disso, estes fármacos de abuso são largamente utilizados há décadas em todo o mundo para a melhoria de performance física e para efeitos estéticos (MPHIL et al. 2014, KOUVELAS et al. 2008). Neste contexto, é importante observar que em humanos o abuso de esteroides anabólicos é realizado com a administração de doses de 10 até 100 vezes maiores do que as utilizadas na terapêutica de reposição hormonal (CLARK et al. 2006).

Um dos compostos à base de testosterona mais utilizados é o propionato de testosterona (PT). O PT faz parte da categoria de testosterona esterificada, na qual a adição do ácido propiônico na posição 17β da testosterona (**Figura 3**) reduz sua polaridade, tornando-o mais lipossolúvel, sendo administrado, principalmente, por via parenteral (NCBI, 2021). Um fator que ajuda no prolongamento da ação desses EAA é o tamanho da cadeia lateral ligado à testosterona, visto que quanto maior a cadeia, maior é a sua meia-vida (VERMEULEN, 1975, NIESCHLAG, 2012). Essa é uma das principais características do PT que a difere das demais testosteronas, isso porque sua meia-vida gira em torno de 4,5 dias, enquanto outras testosteronas, como o cipionato de testosterona e o decanoato de nandrolona, possuem uma meia-vida mais longa, ocorrendo, por volta, de 10-12 e 15 dias respectivamente (NCBI, 2021).

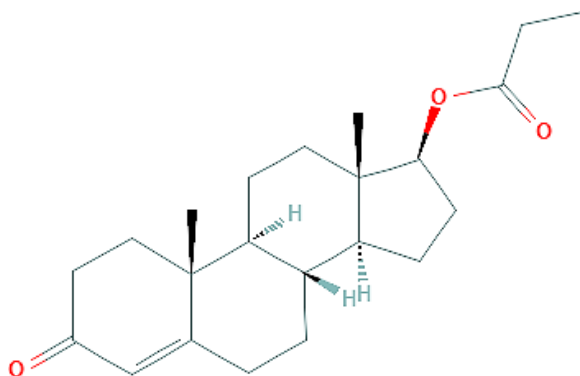


Figura 3. Estrutura química do propionato de testosterona

A administração dessas moléculas esterificadas, principalmente, pela via intramuscular (IM) possui uma importante finalidade. Isso ocorre porque quando injetado com um veículo oleoso, este fica armazenado em forma de depósito intramuscular e, conseqüentemente, é absorvido lentamente para o plasma sanguíneo, contribuindo para prolongar também sua atividade (POPE, 2014; NIESCHLAG, 2012). Essa via confere ao parâmetro da área sobre a curva (biodisponibilidade) uma variação entre 180-210ng h/ml e tempo de residência de 40-60 horas (NCBI, 2021). Por sua vez, o prolongamento da sua atividade acaba por auxiliar no tratamento de condições que necessitam de tratamento crônico (ex: hipogonadismo), reduzindo a frequência de administrações (EDKINS, 1959). Para fins de comparação, se fosse administrada a testosterona não-modificada, mais injeções seriam necessárias, devido a meia-vida curta da testosterona que é de apenas 10 minutos (NIESCHLAG, 2012).

Por possuir uma característica lipossolúvel, o PT pode sofrer sequestro tecidual, que pode ser visualizado pelo valor de seu volume de distribuição (Vd) que varia entre 75-120 L/kg (NCBI, 2021). Como o Vd é um diretamente proporcional à meia-vida ($t_{1/2} = 0,693 \times Vd / Clearance$), em condições não-patológicas, contribui para um tempo maior de biodisponibilidade do fármaco. Por sua vez, sua taxa de *clearance* é menor quando comparado à T, sendo reportado uma taxa de 2000ml/kg (NCBI, 2021).

A administração do PT induz efeitos análogos à testosterona endógena, entre elas o aumento de síntese proteica (contribuindo para um balanço nitrogenado positivo, o que

é um fator importante no ganho de massa muscular), estimula o aumento da atividade osteoblástica, assim como a produção de proteínas da matriz óssea, interferindo, dessa forma, na massa óssea, além de ser um potente estimulador para a eritropoiese (SHAHIDI, 2001). O PT também leva ao aumento de estrogênio, devido sua interação com a enzima aromatase. Portanto, o uso contínuo dessa substância pode elevar os níveis plasmáticos de estrogênios, assim como reduzir os níveis de LH sanguíneos (NCBI, 2021). A administração dessas substâncias em doses elevadas por mulheres pode gerar efeitos colaterais, conhecidas como masculinização, como o engrossamento da voz, crescimento do clitóris, queda de cabelo, crescimento de pelos, mudanças na libido, entre outros (SHAHIDI, 2001). Cerca de 90% do PT administrado por via intramuscular é eliminado na forma conjugada da testosterona e seus metabólitos com os ácidos glicurônico e sulfúrico através da urina, enquanto que o restante, em torno de 6%, é eliminado nas fezes, grande parte na forma não conjugada (NCBI, 2022).

2.3 Aspectos epidemiológicos do uso de esteroides anabólicos androgênicos

O uso de EAA obteve destaque no meio do século XX, ao serem usados para finalidades médicas para o tratamento de algumas doenças (conforme relatado anteriormente). As alterações causadas na estrutura química da testosterona não apenas contribuíram para aumentar suas propriedades e seu tempo de duração, como também para reduzir os seus efeitos androgênicos e aumentar os efeitos anabólicos sobre a massa muscular (DE LIMA, 2011). Dessa forma, este tipo de substância chamou a atenção de certos grupos da população que começaram a fazer uso e aproveitar dos seus efeitos farmacológicos, na qual vale destacar: adolescentes do sexo masculino, atletas de alto rendimento e atletas recreacionais (MPHIL et al. 2014; PIACENTINO et al. 2015).

O uso desse tipo de substância por atletas tem o objetivo de aumentar sua massa muscular e, conseqüentemente, contribuir para o aumento de sua performance (ONAKOMAIYA, 2015). Os primeiros casos de uso de EAA por desportistas datam a década de 1950, principalmente por levantadores de pesos e fisiculturistas, e foi rapidamente difundido entre outras modalidades. Entendendo os possíveis problemas gerados pelo uso desses fármacos em competições esportivas, as primeiras regras antidopagem começaram a entrar em vigor no final da década de 1960 (União Internacional de Ciclistas Internacional - *Union Cycliste Internationale* – 1967; e o Comitê Olímpico Internacional – COI – 1968). A princípio, apenas narcóticos foram banidos, mas, posteriormente, foi ampliado também para os EAA (NIESCHLAG, 2012).

Os efeitos da utilização EAA por atletas foi tema de muita controvérsia por muitos anos. Sabe-se que os EAA promovem crescimento muscular em homens hipogonadais, adolescentes e mulheres. Porém, não está claro que o uso de doses terapêuticas cause efeitos anabólicos em homens saudáveis (NIESCHLAG, 2012). Desse modo, o uso de quantidades elevadas de EAA têm sido empregadas pelos usuários. Para isso, diferentes estratégias para o uso dos variados tipos de EAA têm sido empregadas por essa população. Destacam-se o “stacking” (uso de dois ou mais esteroides de modo a induzir sinergismo e potencializar os resultados), o ciclo (são padrões complexos de utilização de vários fármacos ao longo do tempo, consistindo no uso de diferentes EAAs por um tempo variável que pode ser de 6-12, 4-18, 4-12 semanas, com interrupção do uso podendo variar por pelo menos 4-6 semanas, com a intenção de “limpar o organismo” e poder realizar um novo ciclo) e a pirâmide (consiste no aumento das doses ao longo do tempo, podendo variar entre 10 a 40 vezes mais do que o recomendado, reduzindo as doses posteriormente). Com isso, busca-se obter os melhores resultados com a utilização de EAA e minimizar seus efeitos negativos (GRECCO, 2008; POPE, 2014, ONAKOMAIYA, 2014; ROCHA, 2014). Os EAAs podem ser administrados pela via oral ou utilizado por via intramuscular contribuindo para seus diferentes aspectos farmacocinéticos (maiores detalhes na seção 1.2)

Dados epidemiológicos indicam que milhões de pessoas no mundo inteiro sejam usuárias de EAA, sendo amplamente difundido em diversos países do Ocidente, principalmente, Estados Unidos, comunidade britânica e Brasil, juntamente com outros países da América Latina, assim como o Oriente Médio e a Ásia. Desse modo, o desejo se apresenta além dos objetivos atléticos, se buscando também um corpo mais forte e musculoso (KANAYAMA e POPE, 2018). Com isso, o uso desses compostos que visam aumentar a massa muscular, se encarrega também de elevar a autoestima dos usuários. Todavia, estudos demonstram que o consumo de EAA pode se tornar a porta de abertura para a utilização de outras substâncias como os opiáceos, álcool e outras substâncias psicoativas (maconha, cocaína, anfetaminas) (POPE, 2014; ONAKOMAIYA, 2016).

Em um estudo de Silva-Júnior (2013), o autor buscou analisar as taxas de morbidade entre os anos de 2000-2010 no Brasil devido ao uso de EAA. As informações foram fornecidas pelo banco de dados informatizado do Ministério da Saúde que contém todas as informações sobre internações que são realizadas pelo Sistema Único de Saúde através das Autorizações de Internação Hospitalar (AIH). Nesse estudo, verificou-se que as taxas de internações nos últimos 10 anos em valores relativos foram de 0,0001% (em

valores absolutos de 1.319 = média de $119,9 \pm 99,01$). A síndrome de resistência a andrógenos foi visto como a razão principal da causa, o que corresponde, segundo o estudo, a 55,8% do total de internações no período observado dos dados. Intoxicação por andrógenos e anabolizantes congêneres, assim como o uso exagerado de andrógenos participaram com, respectivamente, 41,35% e 2,6% do total de internações. Segundo o estudo, a idade média de internação seria entre 15 e 29 anos, demonstrando mais uma vez como as idades mais jovens são as mais suscetíveis ao consumo de EAA. O autor ainda discute o fato do número baixo encontrado no Brasil, porém que o mesmo poderia ser devido a subnotificações, visto que em pronto atendimentos não há a presença de AIH (SILVA-JÚNIOR, 2013).

Outro estudo, agora realizado em academias de Porto Alegre/RS, constatou que os locais onde as drogas são adquiridas em sua maioria são as farmácias, ou por meio de contrabando, ou por veterinários e até nas próprias academias. O autor também explana que são, normalmente, os amigos os principais responsáveis por sugerir a compra e consumo dos EAA. As outras fontes seriam a própria automedicação, internet e orientação profissional (MAIOR et. al, 2009).

Verifica-se, portanto, que há pouca preocupação dos usuários com o uso de EAA, esquecendo um dos fatores mais importantes que é a sua saúde, assim como o fato de não levarem em consideração os possíveis riscos envolvidos no uso dessas substâncias (DE LIMA, 2011). Estudos epidemiológicos em humanos e em modelo animal já vêm demonstrando os possíveis impactos na saúde causado pelo uso crônico dessas substâncias, aumentando os riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como manifestações comportamentais que pertencem a estados afetivos e incluem mudanças na libido, agressão, ansiedade, impulsividade, depressão, hostilidade, mania e hipomania (ONAKOMAIYA, 2016). Logo, o entendimento sobre os possíveis riscos aos usuários de EAA e, possivelmente, na sua prole são muito importantes.

2.4 Transtornos de ansiedade, depressão e sua relação com a testosterona

A ansiedade é um sentimento natural do ser humano, na qual é caracterizado por uma sensação de apreensão, advindo de um momento de desconforto futuro. Por ser algo natural do ser humano, é considerado importante no enfrentamento de possíveis perigos que possam ser encontrados. Porém, quando a ansiedade começa a interferir na vida cotidiana, já pode começar a ser encarado como uma possível doença, classificada como transtornos de ansiedade (BRADTNER, 2009, CASTILLO et al. 2000) Este tipo de

patologia é dividido em vários tipos de transtornos (**Tabela 1**) e podem apresentar alto grau de comorbidade entre si (ANDREATINI, 2001, CASTILLO et al. 2000). Para ser considerado como um transtorno de ansiedade, os sintomas devem ser de origem primária, não advinda de outros tipos de doenças como depressão e psicoses (CASTILLO et al, 2000).

Tabela 1 – Classificação dos Transtornos de ansiedade segundo a Associação de Psiquiatria Norte-americana (DSM-5, 2013).

- Transtorno de Ansiedade de Separação
- Mutismo Seletivo
- Fobia Específica
- Transtorno de Ansiedade Social
- Transtorno de Pânico
- Especificador de Ataque de Pânico
- Agorafobia
- Transtorno de Ansiedade Generalizada
- Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância/Medicamento
- Transtorno de Ansiedade Devido a Outra Condição Médica
- Outro Transtorno de Ansiedade Especificado
- Transtorno de Ansiedade Não Especificado

A ansiedade patológica se diferencia da ansiedade normal por sua intensidade, tempo e episódios, caracterizando um grau de sofrimento na pessoa acometida capaz de proporcionar sentimentos negativos e de apreensão pelo futuro (PITTA, 2011). De modo geral, os sintomas dos transtornos de ansiedade envolvem taquicardia, irritabilidade, sudorese, insônia, distúrbio gastrointestinais e cansaço (BRADTNER, 2009, RAMOS, 2009). É importante salientar que como os transtornos de ansiedade são os tipos de doenças que mais crescem no mundo globalizado, acabam sendo responsáveis também por interferir na economia do país. As pessoas acometidas pela doença possuem gastos e perdas elevadas, seja devido as faltas no trabalho quanto pelo custo do tratamento, que podem influenciar ainda mais no agravamento da doença (OLESEN et al, 2012). Como

são capazes de interferir na qualidade de vida, também são responsáveis por reduzir a expectativa de vida (WALKER et al, 2015).

Observa-se que as mulheres possuem maiores riscos de desenvolver transtorno de ansiedade de qualquer tipo e depressão, numa ordem de 2:1 quando comparado aos homens. Na infância, por sua vez, os homens são mais afetados do que as mulheres para o diagnóstico do transtorno obsessivo-compulsivo. Já adultos com 55 anos ou mais parecem ter menos probabilidade de desenvolver transtorno quando comparado com indivíduos mais novos (35-54 anos) (BAXTER et al, 2013).

Sabendo que estas doenças são capazes de interferir na qualidade de vida da pessoa, diversos estudos vêm sendo realizados para elucidar os motivos e assim desenvolver formas de tratamento. A maioria dos tratamentos é realizada através de fármacos desenvolvidos para este fim (farmacoterapia) de diferentes classes: benzodiazepínicos, inibidores da monoamina oxidase, buspirona (agonista parcial 5HT1A), antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ARIKIAN e GORMAN, 2001) que podem ser associados ou não à psicoterapia (BORKOVEC et al. 1995). Apesar deste tipo de farmacoterapia ser o mais utilizado, há relatos de pacientes, que muitas vezes não respondem satisfatoriamente ao tratamento ou abandonam o mesmo, com destaque para os benzodiazepínicos (SINGEWALD, 2007).

Desta forma, um maior conhecimento da neurobiologia da ansiedade pode proporcionar, além da descoberta de novos alvos farmacológicos, o refinamento da terapêutica empregada nessas doenças já que os mecanismos que envolvem estas doenças não são totalmente conhecidos (SINGEWALD, 2007).

Por sua vez, o termo depressão começou a ser introduzido em dicionários médicos ainda no século XIX, por volta dos anos de 1860, sendo aceito e utilizado desde daquela época, o que causou uma restrição cada vez maior do uso da palavra melancolia (CORDÁS, 2002). A depressão, um tipo de doença neuropsiquiátrica, é reconhecidamente uma das patologias que mais crescem no mundo atualmente. É uma doença capaz de alterar profundamente a vida cotidiana de uma pessoa, interferindo e incapacitando a vida social, profissional e familiar da pessoa acometida. O agravamento da depressão pode ser letal à pessoa, pois os riscos de suicídio aumentam profundamente (BRADTNER, 2009).

A tristeza é tida como um sentimento que ocorre naturalmente no ser humano fazendo parte de toda vida de uma pessoa, ligados a sentimentos de perdas, derrotas, desapontamento, entre outros (DEL POTRO, 1999). Porém, quando falamos sobre a

depressão, não quer dizer que a tristeza e a infelicidade sejam sinônimas da doença, apesar de serem sintomas presentes neste tipo de transtorno de humor (LIMA, 2004). O pessimismo decorrente da depressão, normalmente, é descrito pelos pacientes como um grande vazio interior, não tendo vontade de realizar atividades cotidianas que, normalmente, eram prazerosas (anedonia). Os deprimidos se julgam como um peso para os familiares, o que acaba amplificando os problemas relacionados à depressão. Os pacientes, normalmente, possuem dias em que os sintomas da doença não são visíveis, dando entender até que a doença não existe. Porém, nos dias de crise, os pensamentos ruins aparecem, aumentando as chances de suicídio. (DEL PORTO, 1999; LIMA, 2004).

A depressão pode muitas vezes estar mascarada em outros tipos de doenças ou sintomas recorrentes do dia-a-dia, tais como: dores de cabeça, dores no corpo, cansaço, falta de apetite, constipação e etc (GALHARDO, 2010). Os sintomas envolvendo a depressão característicos são a falta de energia, falta de prazer, redução dos aspectos cognitivos, indecisão, insegurança e culpabilidade, o que pode gerar com o tempo o agravamento da doença (DA SILVA, 2003; DEL POTRO, 1999). Alguns aspectos fisiológicos também são observados como a insônia ou hipersonolência, alterações no apetite e diminuição da libido. A depressão também pode afetar os comportamentos sociais dos pacientes, gerando casos de afastamento social, crises de choro, momentos de agitação ou lentificação psicomotora (DEL POTRO, 1999).

Atualmente, têm surgido hipóteses que buscam elucidar as possíveis alterações fisiopatológicas dessas doenças dentro do contexto neurobiológico, sendo elas: hipótese noradrenérgica, serotoninérgica, dopaminérgica, alteração nos ritmos biológicos, aspectos imunológicos, alterações neuroendócrinas (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o eixo hipotálamo-hipófise-gônada), hipótese neurotrófica (CHARNEY e NESTLER, 2017).

No que diz respeito ao eixo hipotálamo-hipófise-gônada, parece haver uma relação entre os níveis de testosterona, distúrbios de ansiedade e depressão, principalmente, em homens acometidos por hipogonadismo (condição patológica onde as gônadas produzem baixas concentrações de testosterona). Homens hipogonádicos tendem a ter maiores taxas de transtornos de ansiedade e depressão quando comparados com homens saudáveis (ZAROUF et al, 2009). Da mesma forma, homens tratados com drogas que reduzem a disponibilidade de testosterona em tratamento de câncer de próstata também tendem a ter maiores chances de desenvolver esse tipo de patologia (DiBLASIO et al, 2008). Por sua vez, observa-se que homens com hipogonadismo, mas que foram tratados com testosterona, tiveram uma melhora do humor, a partir da redução do quadro

ansioso, reduzindo até comportamentos depressivos (MCHENRY, 2014).

Apesar de diversos estudos demonstrarem melhora do quadro ansioso ou depressivo após tratamento com testosterona, há trabalhos que não observaram diferença significativa ni grupo tratado com o placebo. Um estudo envolvendo homens de meia idade (52-62 anos) diagnosticados com depressão pelo DSM-IV e com baixos níveis de testosterona foram tratados com placebo ou enantato de testosterona por 6 semanas e verificaram que mesmo com a normalização dos níveis séricos hormonais, não foi visto melhora ao final do tratamento após aplicação do questionário da Escala de Hamilton para a depressão (SEIDMAN, 2001). Um outro estudo, foi realizado por Kenny et al (2004), dessa vez envolvendo homens idosos (80 ± 5 anos), que apresentavam capacidade cognitiva reduzida, assim como baixos níveis de testosterona, e que foram tratados com enantato de testosterona (200 mg), 3 vezes na semana por 12 semanas. Ao final do tratamento, foi visualizado aumento nos níveis séricos de testosterona, porém sem melhora nos sintomas depressivos após a aplicação de questionários (KENNY et al, 2004).

Apesar dessa inconsistência dos estudos presentes na literatura, a maioria dos trabalhos relatam melhora dos sintomas depressivos e ansiosos, principalmente, em homens velhos que possuem baixos níveis de testosterona devido ao hipogonadismo após o tratamento com testosterona. Mas, o tratamento pode aumentar os riscos de desenvolver alguma doença cardíaca, câncer, policetamia. Portanto, mais estudos ainda são necessários para entender os benefícios e malefícios do uso de testosterona no tratamento dos transtornos de humor (MCHENRY, 2014).

Os estudos envolvendo mulheres e terapia com testosterona ainda são mais limitados, porém há relatos de trabalhos que verificaram uma redução da ansiedade e comportamentos depressivos. A administração de baixas doses de testosterona em mulheres, que tratavam depressão, verificou melhora dos sintomas quando comparado ao grupo placebo. Por sua vez, Davis et al (2001) discutem os cuidados que devem se ter na prescrição de testosterona para mulheres, visto que terapias de reposição de androgênios são, normalmente prescritas para mulheres em pós-menopausa, no intuito de melhorar o humor e o libido, e podem resultar em riscos de desenvolver depressão. O ideal seria uma terapia em conjunto com reposição de estradiol (DAVIS et al, 2001).

A capacidade da testosterona participar na modulação dessas patologias deve-se, principalmente, a presença de receptores em estruturas encefálicas que estão envolvidas no controle do humor, da emoção e da afetividade e, conseqüentemente, envolvidas nos

transtornos de ansiedade e depressão. Estruturas como a amígdala, o córtex pré-frontal, o hipocampo e hipotálamo participam ativamente no controle das emoções em primatas, como os humanos, e em outros mamíferos (NIESCHLAG, 2012). Essas áreas são conhecidas por possuírem receptores para androgênios (AR), assim como para estrogênio (ER α e ER β), sendo, conseqüentemente, importantes áreas de ação dos hormônios sexuais (SARKEY et al, 2008).

Os metabólitos do metabolismo da testosterona, quando formados no encéfalo, são denominados neuroesteróides. Esses neuroesteróides possuem grande afinidade pelos receptores presentes nessas estruturas. A DHT (formada após ação da 5 α -redutase) possui afinidade aumentada pelo AR quando comparado à testosterona. A DHT é metabolizada em 5 α -androstana-3 α -17 β -diol (3 α -diol) ou 5 α -androstana-3 β -17 β -diol (3 β -diol). Esses metabólitos possuem propriedades farmacodinâmicas bem distintas (HODOSY, 2012). O 3 α -diol possui menor afinidade pelo receptor AR, mas age como modulador alostérico do receptor GABA_A, aumentando seu tempo e frequência de abertura. Já o 3 β -diol acaba exercendo suas funções ao se ligar ao receptor ER β . Por fim, a testosterona ainda pode sofrer ação da aromatase, sendo convertida em estradiol, que age sobre receptores ER, mediando ainda mais alterações comportamentais (MCHENRY, 2013).

O modo de ação da testosterona merece também certa atenção. Classicamente, a atividade da testosterona esteve sempre relacionada aos seus efeitos intracelulares de ação genômica, ou seja, ligam-se ao receptor androgênico e são translocados para o núcleo, onde acabam exercendo suas funções. O resultado pode ser visto dentro de horas ou dias dependendo da ação. Porém, foi descoberto que a testosterona poderia apresentar funções não-genômicas ao se ligar a receptores androgênicos presentes na membrana plasmática, exercendo efeitos de início rápido (minutos, horas) (HODOSY, 2012). Importante salientar que para observação dos efeitos estritamente não-genômicos, o intervalo entre a aplicação e o modelo de teste comportamental selecionado deve ser de 30min, visto que após esse tempo já pode ocorrer ações genômicas (FALKESTEIN, 2000) (revisão ampliada sobre o assunto pode ser vista em MCHENRY, 2013).

Logo, pode-se observar a grande variabilidade de resultados presente na literatura envolvendo o uso de análogos de testosterona sobre o comportamento humano e de mamíferos não-humanos. Esses dados refletem ainda mais a necessidade de aprofundamento nas pesquisas envolvendo o uso dessa substância e seus efeitos nas diferentes estruturas do encéfalo, assim como no comportamento.

2.5 Testosterona e agressividade

A agressividade é um comportamento conservado entre diversas espécies, o que demonstra a necessidade desse comportamento para a sobrevivência (DE MOURA OLIVEIRA, 2015). A agressão é definida como um comportamento hostil em relação a outro da mesma espécie (ou não), que tem, na maioria das situações, o objetivo de infligir algum tipo de dor ou dano ao oponente. Por ser um comportamento extremo, acaba sendo metabolicamente caro, ou seja, há um gasto energético alto para iniciar e manter esse tipo de ação. Além disso, a ação agressiva pode ser influenciada por questões fisiológicas ou devido à experiência, como o ciclo circadiano, o nível de estresse, estado reprodutivo e experiências de ganhar e perder, respectivamente. Quando o estímulo agressivo atinge o ponto crítico (limiar), a agressão, normalmente, é desencadeada (LISCHINSKY, 2020).

A agressividade pode ser dividida diferentemente entre os humanos e os demais animais. Nos humanos há, basicamente, dois tipos: (a) a instrumental controlada, que visa um objetivo final, visualizada em casos de homicídio, genocídios e assassinatos. Por ser controlada, parece depender mais de regiões corticais; e (b) reativa impulsiva, que está ligado, principalmente, a sentimentos de raiva, podendo ocorrer de forma repentina, intensa e duradoura (SIEVER, 2008). A agressividade pode ser evidenciada em alguns distúrbios neuropsiquiátricos, como em alguns casos de esquizofrenia, transtornos de personalidade, transtorno bipolar, entre outros. Já os roedores exercem sua agressividade, principalmente, para proteger seu território, busca de comida, proteção da ninhada (agressividade materna), etc (DE MOURA OLIVEIRA, 2015; NELSON e TRAINOR, 2007)

Os estímulos desencadeantes da agressão, por sua vez, podem variar entre as espécies. Enquanto em humanos estímulos visuais e verbais podem contribuir para a agressão, em roedores, por exemplo, a via sensorial olfativa acaba exercendo importante função nas entradas para outras vias relacionados à agressividade. Isso porque a via olfativa, na presença de um intruso, como no conhecido teste de intruso residente, será importante para determinar o sexo, a idade, a condição física, assim como a sua origem, o grau de familiaridade e o risco de dominância. Já em pássaros canoros, a via auditiva acaba exercendo importante função, pois o reconhecimento do canto ou não pode ser um gatilho para a agressão (LISCHINSKY, 2020).

Algumas regiões encefálicas estão envolvidas na expressão da agressividade, abrangendo, por sua vez, regiões corticais e subcorticais. Regiões como o bulbo olfatório (em roedores), o hipotálamo anterior (HA), septo lateral (LS), a amígdala medial (MeA),

hipotálamo anterior (HÁ). Nesse caso, a atividade da AVP demonstrou facilitar a agressão ofensiva, que é normalmente inibido pela 5-HT. O HA parece também ser um importante ponto de convergência para alterações neuroplásticas induzidas por EAAs nestes sistemas neurais relacionados a expressão do fenótipo agressivo (DELVILLE et. al, 2000; GRIMES et. al, 2007).

Outros neurotransmissores parecem contribuir também para o comportamento agressivo. Foi demonstrado que a agressividade está também associada à atividade do sistema GABAérgico. O aumento da atividade GABAérgica no septo lateral (NELSON e TRAINER, 2007), assim como na amígdala medial pósterodorsal (AMpd), foi o suficiente para evocar ataques em camundongos. Por sua vez, a desativação da AMpd aboliu o comportamento de ataque (LISCHINSKY, 2020). Além disso, níveis elevados da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) foram verificados em áreas relacionadas com o comportamento agressivo (hipotálamo anterior, amígdala medial, hipotálamo ventrolateral). Por outro lado, há uma redução do conteúdo proteico desta enzima no septo lateral, após um evento agressivo em hamsters. Juntos, esses resultados contribuem para a sustentação da hipótese da existência de uma comunicação entre os sistemas de controle inibitório realizado pela 5-HT e o GABA, sugerindo um mecanismo pelo qual a maior atividade GABAérgica poderia causar a desinibição de um estado comportamental (ou seja, agressão ofensiva), que é regulada pelo sistema serotoninérgico (GRIMES et al. 2003).

O comportamento de agressividade também pode ser considerado um comportamento motivado, que pode ser fortalecido ou não após vários encontros sociais conflitantes. Logo, foi suposto que o sistema dopaminérgico também estivesse envolvido na agressividade (NELSON e TRAINOR, 2007). Ao que tudo indica, são os neurônios presentes na via mesolímbica, na área tegmental ventral (VTA) e no núcleo accumbens (nAc) que são fortalecidos após episódios repetidos de agressão, mediados, provavelmente, pela via VMHvl—VTA —nAC (LISCHINSKY, 2020). Classes de fármacos que atuam sobre os receptores D2, como os antipsicóticos atípicos (ex: haloperidol), têm sido utilizados há anos para o tratamento de pacientes agressivos (DE ALMEIDA, 2005). Além disso, a utilização de um camundongo nocaute para transportador de dopamina – DAT - (aumentando sua biodisponibilidade sináptica), contribuiu para elevar os episódios de reatividade no teste de hierarquia social (RODRIGUIZ, 2004). Outros neurotransmissores como noradrenalina, ocitocina, opioides, óxido nítrico, assim como os hormônios esteroides, têm sido pesquisados e

podem influenciar os níveis de agressividade do indivíduo (LISCHINSKY, 2020; NELSON e TRAINOR, 2007; SIEVER, 2008)

Outro ponto que deve ser destacado são referentes as evidências epidemiológicas e experimentais, que ligam a administração crônica de esteroides anabólicos com o aumento da agressão em roedores adultos, visualizados no teste intruso-residente (OLIVARES et al., 2013).

Dessa forma, buscamos entender se nosso modelo experimental é capaz de alterar os níveis de agressividade após a administração crônica de propionato de testosterona em camundongos machos, assim como a possibilidade de ser transmitido para a próxima geração.

2.6 Epigenética e herança multigeracional

O corpo humano possui cerca de 30 mil genes, na qual apenas uma parte dela, em torno de 10 mil genes, estão ativos. Esse conjunto imenso de genes formam o genoma humano, que foi sequenciado e divulgado em 2004 (ALBERTS et al, 2017). Os genes fazem parte dos cromossomos, que são corpúsculos compactados localizados no núcleo da célula e são responsáveis por conter toda a informação genética do indivíduo. Por sua vez, os genes presentes nos cromossomos são formados pelo ácido desoxirribonucleico (DNA), que é um composto orgânico extremamente importante para a vida humana. (BEAR et. al, 2002). O DNA possui duas funções importantes: (1) serve como depósito de informações genéticas autorrenovável, na qual a célula é capaz de replicar seus genes antes de repassar aos seus descendentes, possibilitando a passagem das características dos pais aos filhos; (2) é responsável por coordenar todo o desenvolvimento e funcionamento das células através do fenômeno de transcrição e tradução da informação genética em proteínas. Esse segundo papel é chamado de expressão gênica (BORON, 2017).

A expressão gênica é composta por dois eventos principais: a transcrição e a tradução. A transcrição consiste no processo de formação da fita de RNA a partir da molécula de DNA, coordenada pela enzima RNA polimerase II, que é um processo que ocorre no núcleo da célula. Já a tradução é o processo na qual ocorre a síntese de proteínas a partir do RNA e ocorre, por sua vez, no citoplasma. Portanto, para que ocorra a passagem da informação do núcleo para o citoplasma é necessário a presença de um RNA intermediário, conhecido como RNA mensageiro (mRNA). Esse processo forma o conhecido dogma central da biologia, que diz que a informação parte de maneira unidirecional do DNA para a formação de proteínas (BORON, 2017).

O grande tamanho do material genético, na forma de cromossomo, exigiu

mecanismos que possibilitaram a condensação de todo DNA dentro do núcleo. Essas proteínas arquitetonas propiciam proteção contra danos ao material genético, ao mesmo tempo que permitem a interação da RNA polimerase com os promotores e, dessa forma, efetuar a transcrição (HENIKOFF e SMITH, 2015). Este enovelamento feito no DNA ocorre através das histonas e das proteínas não-histonas. Essa compactação forma um complexo DNA-proteínas associadas que dá origem a cromatina. A cromatina tem como elemento básico o nucleossomo que, por sua vez, é composto por um cerne proteico de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e 147 pares de base (pb). Uma quinta histona, H1, não faz parte do cerne central que dá origem ao nucleossomo, mas possui função estrutural importante (BLAKLEY e LITT, 2015).

Cerca de 1/5 dos aminoácidos que formam o cerne do nucleossomo são a arginina e a lisina. Esses aminoácidos possuem carga elétrica positiva, o que acaba aumentando a interação com a molécula de DNA que possui carga elétrica negativa devido à cadeia principal de fosfodiéster. O grau de interação entre o DNA e as histonas podem facilitar ou dificultar a ação da maquinaria transcricional para a ativação gênica (MAZZIO e SOLIMAN, 2012). As histonas também possuem caudas externas que podem sofrer modificações covalentes (metilação, acetilação, fosforilação, SUMOilação, ubiquitinação, entre outros) e também alteram, dessa forma, o nível de compactação desta cromatina (heterocromatina → eurocromatina, ou vice-versa), expondo mais ou não, as regiões codificantes para a expressão gênica (FERREIRA, 2012). **(Figura 5)**.

Diversos estudos demonstram que não apenas o DNA é capaz de sofrer alteração em sua estrutura (mutação), mas as proteínas que fazem parte dos nucleossomos (proteínas histonas e não-histonas) também podem sofrer modificações. Essas modificações são capazes de permanecer durante as próximas replicações celulares e, conseqüentemente, ter a capacidade de influenciar sua descendência. Tais alterações que podem afetar o DNA sem modificar sua sequência nucleotídica é conhecido como epigenética (CONSOLARO, 2009).

Estas mudanças ocorrem por alguns mecanismos epigenéticos importantes:

a) modificações pós-traducionais nas histonas: ocorre por meio de metilações, acetilações, fosforilações, ubiquitinações, SUMOilações nas caudas N-terminais das histonas. Estas modificações que alteram a interação da cromatina com o nucleossomo, comportam-se como verdadeiro, código das histonas (FERREIRA, 2012). O código de histonas ocorre devido a interação com diversas enzimas, sendo cada uma delas responsáveis por determinada função, tais como: *Writes*: responsáveis por estabelecer as marcas epigenéticas sobre as histonas; *Readers*: responsáveis por reconhecer esses sinais; e por fim, *Erases*: responsáveis por reverter essas mudanças (VILLOTA-SALAZAR et al, 2016).

b) RNAs não codificantes: Os RNAs não codificantes são moléculas que interferem na expressão de genes, podendo regular as modificações na cromatina, a impressão gênica, a metilação e a transcrição gênica. Destacam-se os pequenos RNAs nucleolar (snoRNA), pequeno RNA de interferência (siRNA), RNA longo não-codificante (lncRNA), piwiRNA (piRNA), RNA de Inativação X (XiRNA) e os micro-RNAs (VILLOTA-SALAZAR et al, 2016; ZOGHBI et al, 2016).

c) metilação do DNA: consiste na adição de grupamentos metila (CH_3) à base citosina. Esse processo ocorre nas ilhas CpGs (rica em nucleotídeos guanina e citosina) na qual a citosina metilada, agora convertida em metil-citosina, será capaz de modular a expressão de genes e, por conseguinte, regular a transcrição do RNA (DE OLIVEIRA, 2012). De uma maneira geral, as sequências que sofrem o processo de metilação não são transcritas, enquanto as sequências sem metilação são transcritas ativamente (JIRTLE e SKINNER, 2007). Em mamíferos, a metilação do DNA é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que têm como função adicionar o grupamento metil à base citosina. Dentre dessas DNMTs, duas classes se destacam: DNMT1, que realizam a manutenção do padrão de metilação durante a replicação do DNA, sendo, portanto, importante para a metilação durante a divisão celular (LI&ZHANG, 2014); e DNMT3a e DNMT3b, que são responsáveis pela metilação *de novo* DNA durante o desenvolvimento embrionário, na formação de gametas e no imprinting genômico (FERREIRA, 2012; FONSECA, 2021). A metilação do DNA é o mecanismo epigenético melhor compreendido entre todos os mecanismos conhecidos, principalmente no que diz respeito ao seu envolvimento nas heranças epigenéticas ocorridas de uma geração para a outra (OSBORNE-MAJNIK, 2013).

Os processos epigenéticos são altamente complexos, portanto, qualquer distúrbio

em seus mecanismos de estabelecimento ou manutenção de suas marcas podem alterar o funcionamento normal da célula e, conseqüentemente, contribuir para o aparecimento de doenças (DE OLIVEIRA, 2012). Pesquisas nos últimos anos vêm demonstrando que os primeiros meses de desenvolvimento do feto são etapas consideradas críticas para que as alterações no epigenoma do indivíduo possam ocorrer. Assim, as alterações epigenéticas estão se tornando cada vez mais importantes para o entendimento de como algumas doenças podem passar para o herdeiro genético (SKINNER, 2011).

A Origem Fetal das Doenças, conhecida também como a Teoria de Barker, proposta pelo epidemiologista inglês David Barker, trata exatamente sobre esse período crítico de desenvolvimento fetal e suas possíveis implicações na idade adulta. Barker verificou a existência de associação entre a má nutrição materna durante a gestação (levando o feto a adaptações metabólicas ou estruturais) e o aumento do risco para o aparecimento de doenças coronarianas, diabetes mellitus e acidente vascular cerebral (AVC) durante a idade adulta do indivíduo. Todo esse processo pode ser chamado também de programação fetal (SECO e MATÍAS, 2009; MELO, 2017). Em relação à prole gerada e que sofreu interferência diretamente do ambiente, o tipo de herança epigenética é conhecido como herança multigeracional (LI, 2015). Além disso, a prole de fêmeas que sofreu algum estresse durante o período fetal e que tiveram suas células germinativas também expostas ao estresse ambiental, mesmo que indiretamente, podem sofrer também de alterações metabólicas durante a vida adulta. Dessa forma, as características ou as doenças podem ser expressas nas gerações futuras, mesmo que os filhos não tenham sido influenciados diretamente por fatores ambientais, o que é definido como herança transgeracional (SKINNER, 2011) (**Figura 6**)

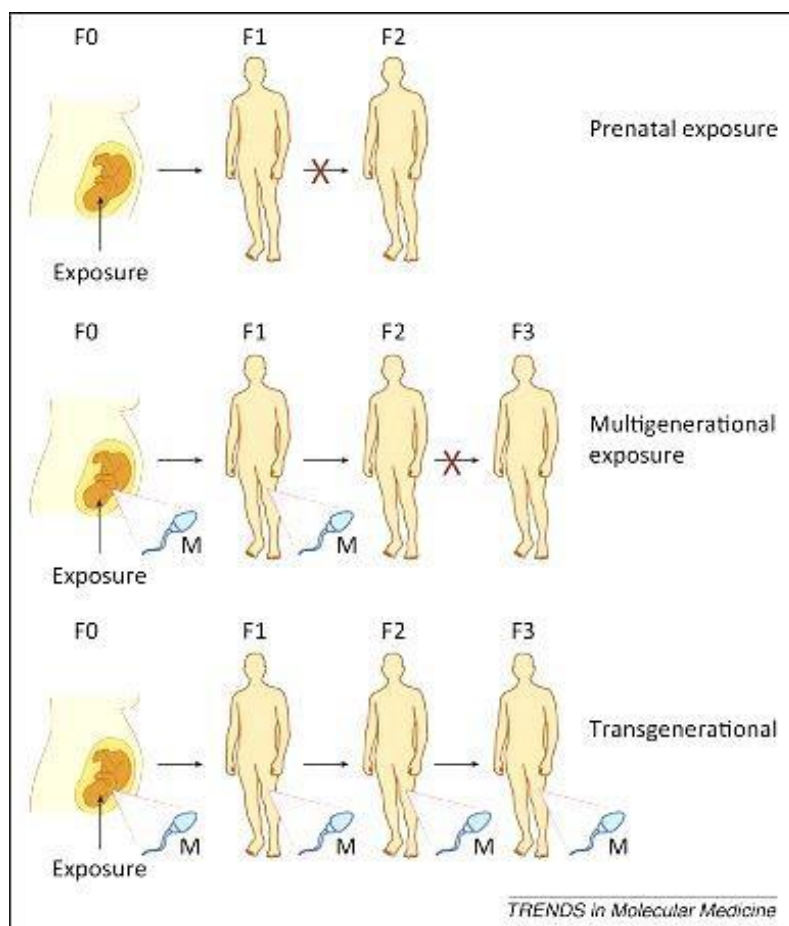


Figura 6. Modos de herança entre gerações. Nesta figura pode ser visto 3 tipos de transmissão geracional de experiência parental. **Linha superior:** Na linha superior ocorre a exposição pré-natal. Nesse caso, a mãe (F0) foi exposta durante o período gestacional juntamente com a prole (F1). Dessa forma, F1 é exposta e programada em diferentes tecidos, porém não será transmitido para a geração seguinte. **Linha central:** Na linha central, ocorre a herança multigeracional. A geração F1 é exposta durante a gravidez, modificando, por sua vez, suas células germinativas. Logo, a modificação ocorrida nas células germinativas de F1 afetará o fenótipo de F2. No entanto, a reprogramação desta modificação durante a diferenciação de células germinativas primordiais de F2 prevenirão a transmissão do fenótipo para F3. **Linha inferior:** Na linha inferior, ocorre a herança transgeracional. A exposição da F1 durante o período gestacional, altera seus gametas. Os espermatozoides F1 modificados afetam o desenvolvimento de F2. Caso as modificações gaméticas não forem apagadas durante a diferenciação das células germinativas primordiais, os espermatozoides de F2 também serão modificados e transmitirão o fenótipo para F3 (Retirado de SZYF, 2015)

A maioria das pesquisas envolvendo a transmissão da herança genética/epigenética esteve, principalmente, focado nos insultos endócrinos e nutricionais de origem materna, e pouca ou nenhuma atenção foi dada aos insultos de origem paterna e sua possível relação no estabelecimento de herança na sua descendência (DAY et al, 2016). Somente nos últimos anos essa relação pai/filhos tem sido melhor estudada ao verificar as possíveis interações paternas na herança epigenética após exposição ambiental. Apesar de muitas delas ainda gerarem controvérsias, exposições do pai a tintas, solventes industriais, agricultura, elementos químicos de guerra, radiações ionizantes,

dieta e estilo de vida já foram relatados na literatura (SOUBRY, 2015).

Um dos primeiros estudos sobre herança transgeracional paterna veio da observação dos impactos causados pela falta de disponibilidade de alimentos intercalados com períodos de fartura alimentar, durante o período de crescimento lento (PCL), em certa população sueca. Esse período de escassez (causados por perdas nas colheitas, guerras e armazenamento inadequados), com momentos de fartura alimentar, ocorreu no final do século XIX e início do século XX, em uma região da Suécia, conhecida como Överkalix (VIEIRA, 2017). Este estudo, realizado por Kaati et. al (2002), aproveitou o bom armazenamento de dados sistema de saúde sueco para ter acessos as informações de mais de 320 pessoas (após as exclusões, foram considerados apenas 239 indivíduos) e verificou que os pais homens que passaram pelo PCL com escassez de alimentos, tiveram filhos com menores riscos de desenvolverem doenças cardiovasculares (hipertensão, acidente vascular cerebral (AVC), doenças coronarianas). Por sua vez, os avôs que passaram pelo mesmo período, na qual a disponibilidade de alimentos era maior, os netos teriam chances aumentadas de morrerem devido à diabetes (KAATI et. al, 2002; VIEIRA, 2017). Por mais que o estudo tenha diversos vieses, dificultando o controle dos resultados, este foi um dos primeiros trabalhos a trazerem luz às possíveis heranças multi e transgeracional de origem paterna.

Um outro trabalho, dessa vez realizado em camundongos, também buscou verificar esse efeito causal na prole. Os camundongos foram submetidos a um período de estresse (privação alimentar) antes do acasalamento, garantindo, dessa forma, que as diferenças visualizadas na prole fossem devidas ao estresse de origem paterna, não aos estresses de origem materno (período gestacional e pré-natal). Como resultado, foi visto que a prole (machos e fêmeas) desses pais que sofreram privação alimentar antes do acasalamento possuíam níveis de glicose sérica mais baixos do que o controle (ANDERSON et. al, 2006).

Considerando que ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas, visto o grande número de possibilidades de efeitos ambientais que podem interferir na vida do indivíduo, nosso trabalho busca entender se a utilização de um tipo de droga de abuso pelo pai, pode ser capaz de alterar o fenótipo da sua prole na idade adulta

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar se a exposição paterna a uma dose supra fisiológica de propionato de testosterona é capaz de alterar os parâmetros comportamentais da prole durante a idade adulta, bem como os mecanismos transcricionais envolvidos.

3.2 Objetivo Específicos

- Avaliar a expressão de comportamento semelhante à ansiedade através do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste da caixa claro-escuro (CCE);
- Avaliar a atividade motora espontânea através do teste do campo aberto (CA);
- Avaliar a expressão de comportamento semelhante à depressão através do teste de suspensão pela cauda (SC);
- Avaliar a memória através dos testes de reconhecimento de objetos (RO), Labirinto de Barnes (LB) e Esquiva Passiva (EP);
- Avaliar o comportamento social através do teste de Interação Social (IS);
- Avaliar a agressividade e a dominância social através do teste do Intruso Residente (IR)
- Avaliar a expressão dos genes *Gad1* (enzima ácido glutâmico descarboxilase 67 - GAD₆₇), *Gabra2* (a subunidade $\alpha 2$ do receptor ácido gama amino bûtirico A - GABA_A), *Bdnf* (*brain derived neurotrophic factor* - BDNF), *Ntrk2* (receptor TrkB), *Tph2* (triptofano hidroxilase 2 - TPH2), *Hrt1a* (receptor 5H-hidroxitriptofano - 5HT1a) e *Th* (tirosina hidroxilase - TH) em amostras de hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal pelo método de RT-qPCR;
- Avaliar a concentração plasmática de testosterona através do método de ELISA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas Swiss Webster com 40 dias de vida e peso aproximado de 20-40 gramas, fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ sendo mantidos em estantes ventiladas (Alesco) com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade a 60%. Além disso, durante este período, receberam água e ração (Purina ®) ad libitum com ciclo de claro-escuro 12-12h. Ao final do período de aclimatação de 7 dias, os animais foram separados em dois grupos

4.2 Tratamento

Para a realização do tratamento, os animais foram separados em dois grupos experimentais: controle e tratado. Ao grupo tratado, administrou-se propionato de testosterona (Androgenol®), enquanto que no grupo controle foi administrado óleo de amendoim (veículo). Dessa forma, buscou-se que o processo de estresse envolvido no processo administração fosse o mesmo.

Para a preparação da solução, foram utilizados 7,5mL da solução de Androgenol® (10 mg/mL), diluídos em 2,5 mL de óleo de amendoim. A concentração final do PT foi de 7,5 mg/mL. O cálculo utilizou como referência 0,1 mL para cada 100 g de animal. A dose de propionato de testosterona administrada, portanto, foi de 7,5 mg/kg (MARTINEZ-SANCHIS, 1998). A via utilizada para administração, tanto para o veículo quanto para o anabolizante, foi a via subcutânea, duas vezes por semana durante 5 semanas. A área escolhida para administração foi o espaço interescapular na região dorsal do animal. A administração foi realizada entre às 11 hs e 13 hs.

À fim de evitar o efeito de retirada do fármaco, que poderia ser uma variável de confusão em nosso trabalho, o protocolo de tratamento não foi interrompido durante as etapas de acasalamento e testes comportamentais. Dessa forma, os animais foram submetidos à mais 3 administrações durante o período, totalizando, portanto, 13 administrações.

4.3 Delineamento Experimental

Protocolo 1

Para a formação dos grupos foram utilizados 10 camundongos machos, divididos em grupo controle (n=5) e grupo tratado (n=5). No protocolo 1, os animais submetidos ao tratamento não realizaram a bateria de testes comportamentais, sendo realizado apenas pela prole (**Figura 7**)

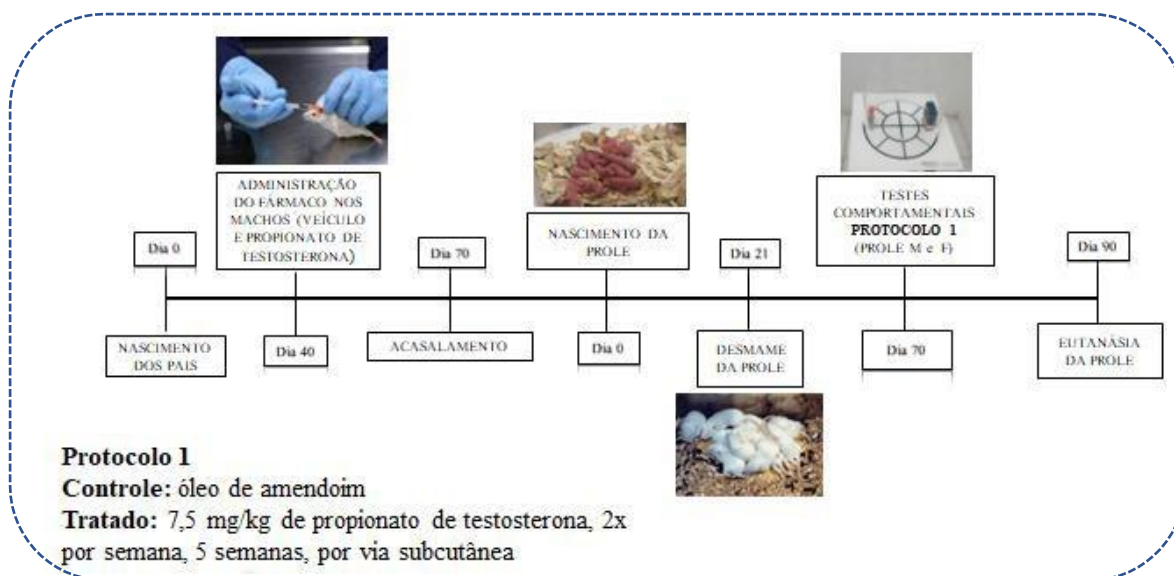


Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo 1

Durante o período de acasalamento, tais animais foram distribuídos em caixas com as seguintes dimensões 34 cm x 40 cm x 20 cm (largura x comprimento x altura) com uma razão 2:1 (2 fêmeas para 1 macho). Dessa forma, se tinha durante o período de acasalamento 20 fêmeas, sendo 10 fêmeas para cada grupo. Nos dias subsequentes à exposição inicial ao macho, as fêmeas eram avaliadas para a presença de plug vaginal para confirmação do coito bem-sucedido.

Após o período de acasalamento, a ninhada foi padronizada em 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas. Os demais animais da ninhada que não formaram os grupos foram submetidos a eutanásia. Aos 21 dias de vida, os animais também foram submetidos ao desmame e, conforme o tratamento paterno, foram separados em dois grupos: geração F1 controle e geração F1 tratado (prole 7,5 mg/kg). Ao completar 70 dias de vida, a prole adulta de camundongos machos e fêmeas foram submetidas a bateria de testes comportamentais composta por: campo aberto (CA), reconhecimento de objetos 6 horas (RO 6h), caixa claro-escuro (CCE), labirinto em cruz elevado (LCE) e suspensão pela cauda (SC) (**Figura 8**). A ordem estabelecida foi proposta de uma maneira que os animais

fossem avaliados do método menos invasivo para o mais invasivo. Por sua vez, a realização da bateria comportamental ocorreu com 24h de intervalo entre um e outro método de avaliação (MCILWAIN et al., 2001). A realização desses testes submetidos nos mesmos animais, permite determinar, a partir de diferentes paradigmas, fenótipos comportamentais correlatos que podem estar presentes em vários domínios e funções no SNC. É importante destacar que a prole M foi submetida a toda bateria de testes primeiro, seguida, posteriormente, pela prole F.

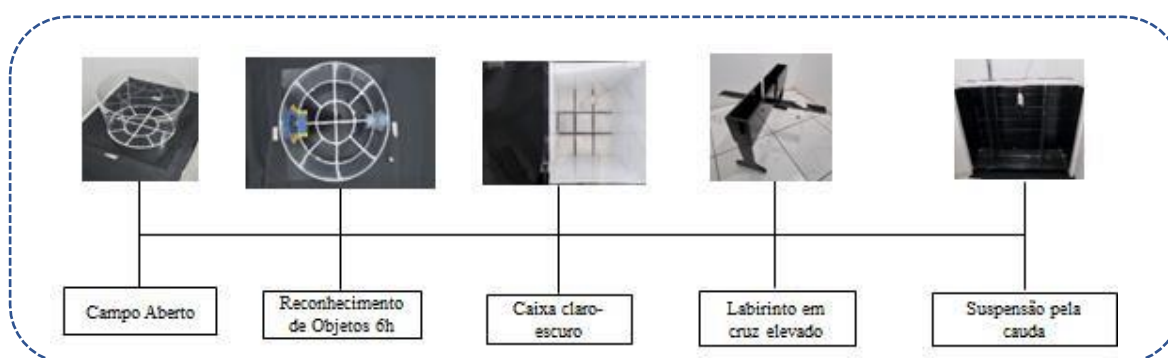


Figura 8. Bateria de métodos de avaliação comportamental da prole F e M

Ao final da bateria de testes comportamentais, a prole foi submetida à eutanásia para a coleta da amígdala total, hipocampo, mesencéfalo e córtex pré-frontal. Assim que coletados esses tecidos eram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o término do processo de eutanásia, os tecidos foram armazenados a -80°C para posterior análise de expressão gênica através da técnica de qRT-PCR.

Protocolo 2

Posteriormente, um novo protocolo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da administração de PT nos pais machos submetidos ao tratamento, assim como avaliar a prole M e F em métodos de testes complementares não realizados no protocolo 1 (**Figura 9**).

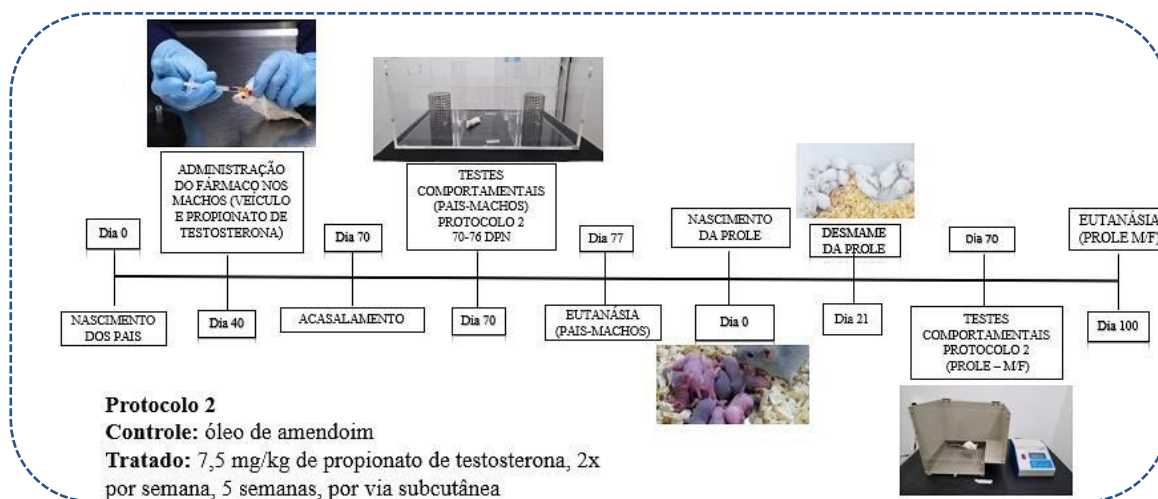


Figura 9. Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo 2

Dessa forma, para a realização do protocolo 2, foram utilizados 59 camundongos machos para a formação dos grupos controle (n=28) e tratado (n=31). Desse total de animais, realizamos uma nova distribuição de modo que uma parte fosse submetida a bateria de testes comportamentais logo ao final do tratamento (controle=23, tratado=25), enquanto uma outra parte foi colocada em acasalamento (controle=5, tratado=6).

Os animais foram mantidos em caixas com as seguintes dimensões: 34 cm x 40 cm x 20 cm (largura x comprimento x altura), sendo até 7 machos em cada caixa por grupo. Ao final do tratamento os machos colocados para acasalamento foram distribuídos em caixas individuais com uma razão de duas fêmeas para cada macho. Dessa forma, durante o período de acasalamento, havia 22 fêmeas, sendo 10 pertencentes ao grupo controle e 12 ao grupo tratado. Nos dias subsequentes à exposição inicial ao macho, as fêmeas eram avaliadas para a presença de plug vaginal.

Ao término do período de tratamento, os animais tratados com PT ou óleo de amendoim (F0) foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais a fim de avaliar as possíveis alterações comportamentais induzidas pelo uso da substância. A bateria comportamental consistiu nos seguintes testes em suas respectivas ordens de realização: CA, RO 6 horas, CCE, LCE, interação social (IS), intruso residente (IR) e SC (**Figura 10**). A ordem estabelecida foi proposta de uma maneira que os animais fossem avaliados do método menos invasivo para o mais invasivo. Por sua vez, a realização da bateria comportamental ocorreu com 24h de intervalo entre um e outro método de avaliação (MCILWAIN et al., 2001).

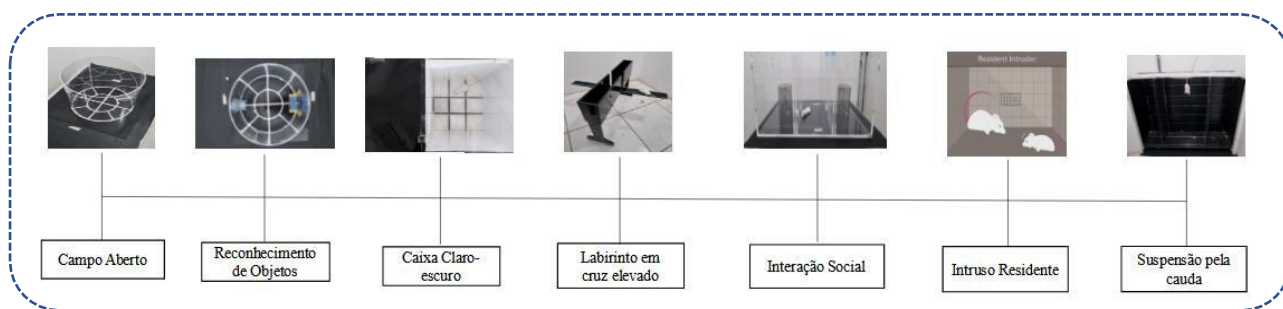


Figura 10. Bateria de métodos de avaliação comportamental dos pais submetidos ao tratamento com PT (F0)

O processo de padronização das ninhadas, desmame e separação dos grupos experimentais foi realizado exatamente como descrito no protocolo 1 do experimento.

A prole (F1), tanto os machos quanto as fêmeas, também foram submetidos aos métodos de avaliação comportamental complementar aos realizados no protocolo 1. Os métodos foram divididos em: bateria de testes de memória (RO 24 horas, Labirinto de Barnes e Esquiva-Passiva), além da realização dos métodos IS e IR (**Figura 11**). É importante destacar que para a realização dos testes comportamentais, um animal de cada prole obtida de diferentes ninhadas foi aleatoriamente utilizado para a formação dos grupos controle e tratado. Dessa forma, foi formado grupos para a bateria de memória (controle=11, tratado=11), e outros 2 grupos para o teste de sociabilidade (controle=11, tratado=11) e agressividade (controle=11, tratado=11).

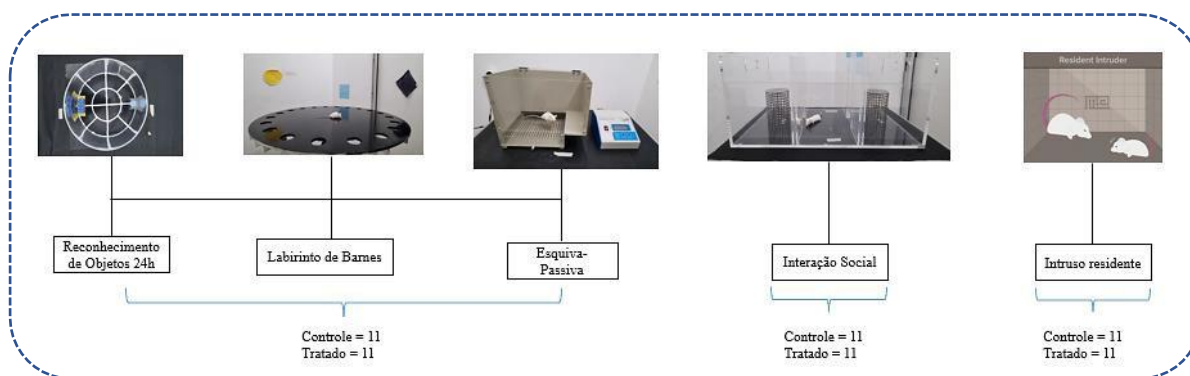


Figura 11. Métodos comportamentais da prole F e M

Assim como na 1ª etapa, ao final da bateria de testes comportamentais, tanto os animais submetidos ao tratamento quanto a prole foram submetidos à eutanásia para a coleta da amígdala total, hipocampo, mesencéfalo e córtex. Assim que coletados esses tecidos eram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o término do processo de eutanásia, os tecidos foram armazenados a -80°C para posterior análise de

expressão gênica através da técnica de qRT-PCR. O sangue também foi coletado e armazenado para análise dos níveis plasmáticos de testosterona pelo método ELISA

4.4 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos utilizados neste estudo estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em consonância com a Lei 11794 de 8 de outubro de 2008 e o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996). Este trabalho recebeu protocolo da CEUA de nº012282/2017.

4.5 Métodos de avaliação comportamental

4.5.1 Ansiedade e depressão

4.5.1.1 Campo aberto (CA)

Este teste é um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes tem sido amplamente utilizada para determinação de emocionalidade (ROTH e KATZ, 1980; SEIBENHENER et. al, 2015) e da atividade locomotora espontânea e exploratória em roedores (WALSH e CUMMINS, 1976). Além disso, este teste também é considerado um excelente modelo sensível a drogas com propriedades ansiolíticas. O protocolo do teste segue as orientações metodológicas sugerido por Prut e Belzung (PRUT e BELZUNG, 2003).

Imediatamente antes do ensaio, cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa circular, de acrílico (30 cm de diâmetro) dividida em duas diferentes zonas (central e periférica), onde os mesmos foram permitidos a explorar o ambiente por 5 minutos. A iluminação da sala de teste ficou em 30 lux (DAO, 2009). Nesse protocolo, foram avaliados número de quadrantes totais, número de quadrantes centrais, o número de rearings (levantamento das patas dianteiras pressionadas contra a parede da arena), comportamento de autolimpeza (grooming), o tempo de permanência na zona central, razão central (relação entre número de quadrantes centrais e totais) e número de bolos fecais. Neste teste, a atividade locomotora/exploratória é indicada pela distância total percorrida e pelo número de rearings, enquanto o número de bolos fecais é utilizado para avaliar o grau de emocionalidade. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência na área central e pela razão central (MCILWAIN et al, 2001).



Figura 12. Campo Aberto (Foto: acervo do autor)

4.5.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado reflete um conflito entre a preferência dos roedores por áreas protegidas e sua motivação natural de explorar novos ambientes. Dessa forma, este teste presta-se à avaliação de aspectos relacionados à ansiedade e ao medo (PELLOW et al, 1985). Além disso, durante este teste, é possível avaliar aspectos que envolvem a tomada de decisão dos animais, que está diretamente relacionado à análise de risco e, consequentemente, com o status de ansiedade (MIKICS et al, 2005).

O aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) cruzados por dois braços opostos fechados (25 x 5 x 16 cm), situados a 40 cm de altura do chão. As pequenas paredes (1cm) nos braços abertos contribuem para reduzir o número de quedas dos animais (KOMADA et. al, 2008), assim como permitir uma maior exploração dos animais no aparato, visto que a aversão ao espaço aberto deve ser o principal comportamento ansiogênico do que a aversão a ambientes altos em camundongos (TREIT et. al, 1993). Os braços são conectados por

uma plataforma central (5 x 5 cm), cuja estrutura é semelhante a uma cruz grega. Desse modo, os camundongos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos. A iluminação da sala durante o período de teste foi de 100 lux (KOMADA et. Al, 2008).

Durante este período, foram registrados parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade tais como: o tempo cumulativo e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados. No entanto, é importante frisar que somente foi contabilizada como entrada aquela tentativa em que os animais posicionavam todas as patas em um dos quatro braços. Após a avaliação dos parâmetros anteriores, a percentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central foram calculados. Além disso, o comportamento de tomada de decisão foi avaliado pelo número de extensões das patas posteriores (SAP).



Figura 13. Labirinto em cruz elevado (Foto: acervo do autor)

4.5.1.3 Caixa claro-escuro (CCE)

Esse teste é baseado na aversão inata dos roedores por locais fortemente iluminados e por ambientes novos (CRAWLEY e GOODWIN, 1980).

O protocolo de teste segue as orientações metodológicas sugerido por Chaouloff et. al (1997). Nesse protocolo, os animais foram alocados individualmente em uma caixa de acrílico (45cm x 27cm x 27cm) dividida de forma desigual em dois ambientes divididos por uma divisória dotada de uma pequena abertura, que permite a transição dos indivíduos no aparato. Dois terços do ambiente é fortemente iluminado (400lux), enquanto a outra porção é escura (10 lux). Desse modo, os animais foram colocados no lado escuro, onde foram permitidos explorar o aparato por 5 minutos. Durante esse período, foram analisados o número de transições e o tempo de permanência no ambiente claro, bem como a latência de entrada no ambiente mais iluminado. Todos esses parâmetros são relacionados com o comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, o comportamento de tomada de decisão e exploração foram avaliados pelo número de SAP e pelo número de rearings realizados na parte clara do aparato, respectivamente.

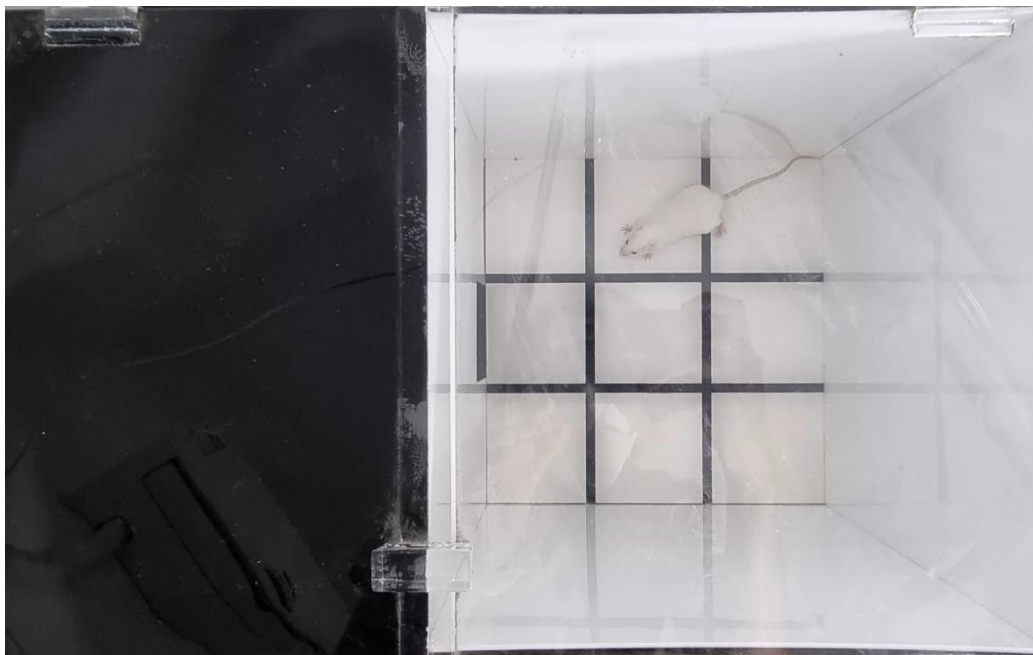


Figura 14. Caixa Claro-Escuro (Foto: acervo do autor)

4.5.1.4 Suspensão pela cauda (SC)

Este teste baseia-se na observação de que os roedores após a execução inicial de movimentos vigorosos orientados de escape desenvolvem uma postura imóvel quando

colocado numa situação estressante inevitável (CASTAGNÉ et al, 2011; STERU, 1985; JUSZCZAK, 2006).

O protocolo de teste segue as orientações metodológicas sugerido por Can (2012). Nesse teste, a condição envolve o estresse hemodinâmico inescapável causado pelo fato de os animais estarem pendurados pela cauda. Para realização desse protocolo, os camundongos eram fixados em uma haste à 100 cm do chão com auxílio de uma fita adesiva. Durante o intervalo de 5 minutos, foram contabilizados os seguintes parâmetros: a latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade. O período de imobilidade pressupõe um índice de desespero comportamental, na qual pode ser visto como a perda da expectativa em fugir. Esse comportamento parece estar de acordo com as observações clínicas observadas em pacientes com depressão, que, normalmente, apresentam uma hipoatividade motora (O'LEARY e CRYAN, 2009). A iluminação utilizada durante o teste foi 50 Lux.



Figura 15 Suspensão pela cauda (Foto: acervo do autor)

4.5.2 Agressividade (Intruso residente - IR)

A agressividade é um comportamento natural conservado filogeneticamente conservado em grande parte dos animais, o que denota uma grande importância para a sobrevivência da espécie. Essa importância se justifica, principalmente, pela necessidade de obtenção e conservação dos alimentos, pela territorialidade e pela procura de um coespecífico sexual. Dessa forma, em roedores, é comum observar interações olfativas (ânus-genital), movimentos de fuga e perseguição, que acabam resultando em comportamentos de enfrentamento, abrangendo mordidas, luta (boxing) e posturas ofensivas (DE MOURA OLIVEIRA, 2015; NELSON e TRAINOR, 2007)

Para a realização do teste, os animais foram mantidos individualmente em uma caixa 2h antes da realização do teste, com o objetivo de estimular a territorialidade do ambiente. Posteriormente, um animal intruso foi colocado no ambiente, sem que houvesse nenhuma restrição, por um período de 10 minutos de teste, possibilitando a interação com o animal teste. Os parâmetros avaliados foram: latência para o primeiro ataque, número de ataques, perseguição, interação ânus-genital, tail rattle (considerado como o movimento de chacoalhar a cauda quando em contato com o animal (MICZEK et. al, 2001).

4.5.3 Sociabilidade (Interação social - IS)

As interações sociais são um componente adaptativo fundamental da biologia de inúmeras espécies. O reconhecimento social é fundamental para a estrutura e estabilidade das redes de relacionamentos que definem as sociedades. Para animais, como ratos, o reconhecimento de espécies específicas pode ser importante para manter a hierarquia social e para a escolha do parceiro (KAIDANOVICH-BEILIN, 2011).

O aparato de sociabilidade é composto por uma caixa retangular de 3 câmaras. Cada câmara mede 19x45cm e as paredes divisórias são de acrílico transparente, com uma seção aberta, que possibilita a passagem livre do animal pelos compartimentos. Em cada câmara lateral, de igual dimensão, será colocada gaiola gradeada de mesmo tamanho. As grades possuem fenestrações para a passagem de ar entre o interior e o exterior, o que possibilita a interações entre os animais, mas sem interações físicas.

Para a realização do teste, foi permitido ao animal um período de habituação total ao aparato de 10 minutos, o que significou a livre exploração das três câmaras a fim de reduzir a preferência por algum dos copos. Ao fim dos primeiros 10 minutos, o animal testado foi retirado e todo o aparato foi limpo com álcool 70%. Posteriormente, foi

colocado um primeiro animal desconhecido, de mesmo sexo, linhagem e idade que o animal testado, enquanto o outro lado permaneceu vazio. O animal em teste foi colocado novamente no centro do aparato e permitido interagir com as câmaras durante 10 minutos. Sobre os copos foram colocados bebedouros, com o objetivo de não permitir a escalada do animal sobre a gaiola. Os seguintes parâmetros foram analisados: tempo de contato com o animal estranho 1 e a gaiola vazia, tempo de permanência nos compartimentos, tempo de autolimpeza (grooming) e agressividade (tail rattle), assim como o índice de sociabilidade (tempo com o estímulo social / tempo com o estímulo social + tempo com o estímulo não social). O primeiro momento do teste é referido como sociabilidade, ou seja, o comportamento do animal interagir com um semelhante coespecífico de mesma espécie. Ao final dos dez primeiros minutos, o animal testado foi novamente retirado da caixa, e todo o aparato foi limpo com álcool 70% para retirada de pistas olfativas.

Após esta etapa um segundo animal foi colocado dentro da gaiola gradeada no lado oposto (a mesma que estava vazia no início do teste). O animal teste foi novamente colocado no centro do aparato e permitido interagir por mais dez minutos de teste. Este segundo momento é referido como novidade social, e se espera que o animal teste dispenda mais tempo com o novo animal em detrimento do animal familiar, o que vai de acordo com os comportamentos naturais da espécie. As mesmas variáveis realizadas na sociabilidade foram analisadas, diferenciando apenas o comportamento do animal entre os animais familiar e novo. A duração do teste nesta etapa também foi de 10 minutos. Portanto, a duração do teste foi de 40 minutos, considerando o tempo de retirada do animal e limpeza do aparato entre os diferentes momentos. Dessa forma, aspectos críticos do comportamento social como aflição e motivação social, assim como a memória e aprendizado, podem ser avaliados durante a realização do teste. Optou-se por uma iluminação do ambiente para o teste de 50 Lux com o objetivo de reduzir os efeitos ansiogênicos causados pela forte iluminação. O protocolo de teste segue as orientações metodológicas sugerido Rein et. al (2020).

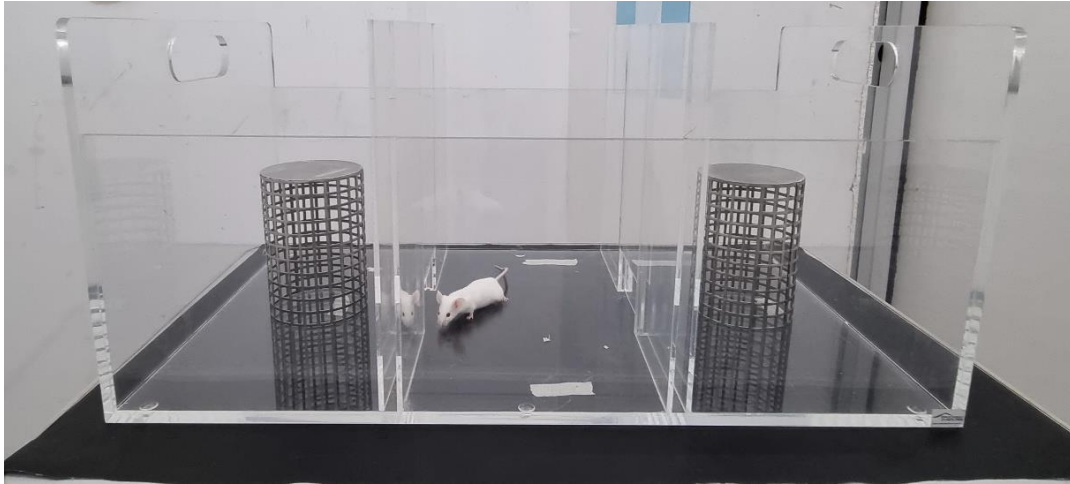


Figura 16. Interação Social (Foto: acervo do autor)

4.5.4 Memória

4.5.4.1 Reconhecimento de objetos (RO)

A tarefa de reconhecimento de objetos é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (ENNACEUR, 2010).

Para este propósito, foi utilizado o mesmo aparato do campo aberto como contexto para execução desse protocolo experimental. Dessa forma, cada animal foi habituado no aparato na ausência dos objetos e outros estímulos comportamentais durante 5 minutos no dia anterior ao teste. No dia seguinte, ao término do período de habituação, os animais foram submetidos a uma sessão de treino para aquisição de memória. Desse modo, dois objetos iguais (A1 e A2), feitos de plástico transparente e preenchidos de areia artesanal cinza foram colocados nos polos do aparato usado para o teste. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena, sendo contabilizado o tempo de exploração dos objetos familiares até que se alcançasse 20 segundos ou chegasse aos 3 minutos de habituação. Após 6 e 24 horas de intervalo, os animais foram reexpostos ao contexto para realização do teste de reconhecimento de objetos. Nessa etapa, usada para avaliação da capacidade de retenção de informações, foram usados um objeto familiar (a) e um objeto novo (b), também de plástico, mas constituídos por peças montáveis coloridas. O teste de retenção teve duração de 5 minutos. A iluminação da sala durante o teste foi de 15 Lux (LEGER, 2013).

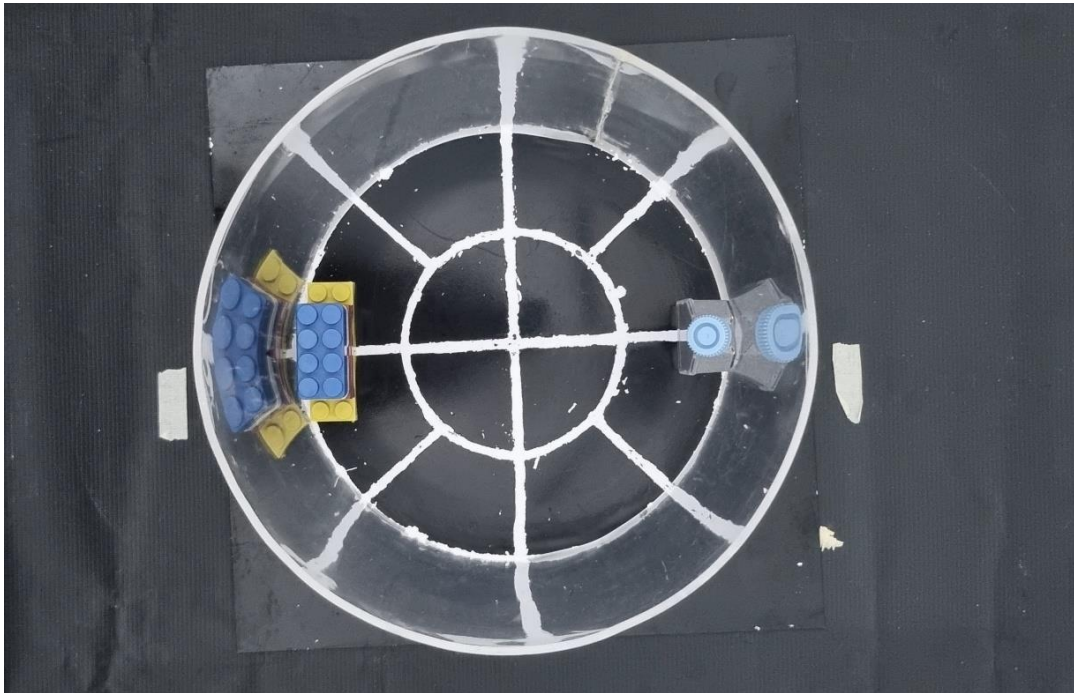


Figura 17. Tarefa de reconhecimento de objetos (Foto: acervo do autor)

Vale ressaltar que entre cada animal testado, a arena e os objetos foram devidamente higienizados com álcool 70 % a fim de anular qualquer tipo pista olfatória. Ademais, o ato de exploração dos objetos só foi considerado quando os animais colocavam o focinho a uma distância de até 2 cm em direção aos objetos. Qualquer outro tipo de contato físico, como se apoiar ou subir nos objetos, não foi considerado como ato exploratório. As medidas utilizadas para inferência de resultados seguiram as orientações conforme descrito por Lueptow (2017).

- Uma medida de exploração pode ser realizada ao somar o tempo de interação do animal com o objeto conhecido (a) e o objeto novo (b): $e2 = a + b$
- O cálculo de $d1$ é realizado através da diferença entre o tempo de interação com o objeto novo ($a1$) e o tempo de interação com o objeto conhecido ($a2$). Este valor absoluto de discriminação ($d1$) não considera as diferenças existentes entre o tempo de exploração total dos objetos dos grupos examinados, embora, em certas circunstâncias, tal índice possa ser mais sensível. É calculado da seguinte forma: $d1 = b - a$
- Para o cálculo de $d2$, deve se dividir a diferença entre o tempo de interação com o objeto novo ($a1$) e o tempo de interação com objeto conhecido ($a2$), ou seja, o próprio $d1$, pelo tempo de exploração total ($e2$). A medida utilizada é um valor de

discriminação relativa, referido como o índice de discriminação 2 (d2). Esse índice não é influenciado por diferenças no tempo de exploração. Isso significa que todos os valores ficarão entre -1 e +1: $d2 = d1 / e2$

- Uma outra forma de cálculo pode ser realizada para se obter o índice de reconhecimento ou preferência (d3). Este índice é calculado através da divisão entre o tempo de exploração com o objeto novo pelo tempo total de exploração com os dois objetos (e2). Isso significa que todos os valores ficarão entre 0 e 1. Este valor pode ser multiplicado por 100 e usado como valor percentual: $d3 = b / e2 * 100$

Tabela 02: Fórmulas usadas na avaliação da tarefa de reconhecimento de objetos.

Exploração	Índice de discriminação
$e2 = a + b$	$d1 = b - a$
	$d2 = d1 / e2$
	$d3 = (b / e2) * 100$

4.5.4.2 Labirinto de Barnes (LB)

O teste do Labirinto de Barnes (*Barnes maze*) foi desenvolvido a partir da adaptação do teste original do Morris Water Maze Test (MWMT), com a finalidade de avaliar o aprendizado e a memória espacial de roedores. Assim como o MWMT, este teste aproveita de pistas visuais colocadas no ambiente e um local fixo de escape, sendo, portanto, tarefa-dependente do hipocampo (GAWEL, 2019). Em relação ao MWMT possui como vantagem a retirada do componente aquático, no qual o animal deveria nadar para encontrar o local seguro. Dessa forma, procurou-se retirar essa possível variável de confusão, que acaba dificultando a interpretação dos resultados (PITTS, 2018). No teste LB, apesar de não possuir o nado como estresse, o roedor acaba sendo conflitado com sua aversão natural a ambientes abertos e iluminados (podendo ser caracterizados como reforçadores negativos fracos do teste), o que pode ser uma motivação para sua entrada no abrigo (GAWEL, 2019)

O aparato do Labirinto de Barnes (Insight®) consiste de uma plataforma circular, elevado a 100cm do chão, na cor preta, composta por 20 buracos, sendo que, em um desses buracos, há a presença de um abrigo, na qual o animal pode entrar durante o teste.

O protocolo possui um total de 1 dia de ambientação, 5 dias de aprendizado, finalizando com o teste de aprendizado no último dia. A organização se deu da seguinte forma:

- **Ambientação:** Esta etapa tem como objetivo familiarizar o animal com o aparato, além de reduzir os níveis de ansiedade que poderiam afetar o desempenho do animal no teste. Por sua vez, o animal foi colocado no centro do aparato, coberto por copo escuro, durante 10 segundos, que foi, posteriormente, levantado. Dessa forma, permitiu-se a livre exploração do animal durante 1 minuto. A utilização do copo teve como objetivo randomizar a orientação espacial do animal a cada tentativa (GAWELL, 2019). Ao término do tempo, se o animal não entrasse de forma espontânea no esconderijo, este era direcionado gentilmente ao local, permitindo-o ficar por mais 1 minuto, retornando a sua caixa ao final do treino;
- **Aprendizado:** Esta etapa é realizada 24h após o período de ambientação e consiste nos dias 1, 2, 3, 4 e 5, nos quais o animal é exposto duas vezes ao dia ao aparato. Cada sessão teve a duração de 3 minutos ou até o animal encontrar o abrigo. Se ao final do tempo de cada sessão, o animal ainda não tivesse encontrado o local, o mesmo era colocado manualmente dentro do esconderijo e permitido ficar por 15 segundos. Os parâmetros analisados foram: latência para encontrar o buraco, número de erros até encontrar o buraco, número de erros total;
- **Teste de aprendizado:** essa etapa é realizada no 6º dia de teste e se avalia a retenção de memória do animal, ao se verificar a latência do animal para explorar o esconderijo, que agora se encontra fechado. Esta etapa tem duração de 1 min e 30 segundos. Os parâmetros analisados foram os mesmos que os avaliados durante o aprendizado;



Figura 18. Labirinto de Barnes (Foto: acervo do autor)

Para a realização do protocolo experimental, foi fixado no local pistas visuais na parede, que permaneceram inalteradas durante todo o teste, principalmente próximo ao esconderijo, de modo a contribuir ao animal em encontrar o local alvo. Conseqüentemente, o abrigo permaneceu sempre no mesmo local. A iluminação da sala durante o teste foi de 850 Lux.

Ao final de cada etapa, a plataforma central e o esconderijo eram limpos com álcool 70%, com a finalidade de evitar que pistas olfativas facilitassem ao animal encontrar o local.

4.5.4.3 Esquiva passiva (*step down passive avoidance*)

Este teste consiste no aprendizado em um determinado contexto, associado a um estímulo aversivo (ex: choque elétrico). Nesse sentido, a evitação passiva é um comportamento do animal em evitar retornar ao ambiente anteriormente aversivo, mantendo-se, por sua vez, no local considerado mais seguro. Assim, a esquiva passiva compreende aspectos semelhantes ao medo contextual preconizado por Pavlov com uma resposta mensurável de evitação a uma determinada área punitiva (contextualizada) (ÖGREN et. al, 2010).

O aparato de esquiva passiva (Insight®) consiste em um equipamento confeccionado em alumínio de 2 mm, com pintura epóxi de alto impacto, na cor bege claro, chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 7 mm, área interna de fuga

com 200 mm x 75 mm, porta e frente em acrílico transparente, bandeja coletora de dejetos e urina. Possui uma alimentadora 127/220V com faixas de correntes que variam entre 100uA e 2000uA, com duração das correntes de 100ms a 30000ms.

O protocolo possui 5 dias de realização com intervalo de 24h entre cada etapa. A primeira etapa consistiu na habituação do animal ao aparato por um período de 5min. Nesse sentido, o animal foi colocado na plataforma elevada e permitido a exploração e ambientação ao aparato com o objetivo de reduzir o estresse do animal ao teste. Após 24h, o animal foi novamente colocado pelo experimentador na plataforma elevada, onde o mesmo aguardou a descida do animal e o contato com as quatro patas sobre as barras para emitir três choques elétricos (0,4mV – 2seg cada choque) nas patas do animal. Após o choque, o animal foi retirado do teste. Após mais 24h, o animal foi novamente recolocado na plataforma elevada e foi mensurado a latência para a descida do animal durante 3 minutos de teste. Essa etapa foi repetida por 3 dias seguidos. Nesta etapa, não houve o estímulo aversivo de choque, portanto, o experimentador não ficava na sala. O resultado aumentado para o animal descer da plataforma pode ser um bom indicador para retenção de informação (KAMEYAMA et. al, 1986). A iluminação da sala foi mantida em 100 lux durante os dias de teste.



Figura 19. Esquiva Passiva (Foto: acervo do autor)

4.6 Eutanásia e coleta de material biológico

Para a realização da eutanásia, os animais foram individualmente transportados até a sala de cirurgia sendo submetidos à eutanásia por sobrecarga anestésica. Para este propósito foi utilizada uma associação entre Xilazina (8 mg/mL), um sedativo alfa 2 adrenérgico, e Cetamina (60 mg/mL), um anestésico dissociativo, pela via intraperitoneal, na proporção de 0,01 mL/g. Logo, a dose utilizada foi de 8 mg/kg e 600 mg/kg, respectivamente. Após a verificação e ausência dos sinais reflexos de dor (reflexo da pata, reflexo da cauda), foi realizada punção cardíaca para retirada de sangue. O material coletado foi colocado em tubos que continham heparina. Ao final da punção cardíaca, seguiu-se a decapitação. Os encéfalos foram rapidamente removidos e dissecados manualmente para a retirada das seguintes regiões: amígdala, mesencéfalo, hipocampo e córtex pré-frontal. As estruturas retiradas foram armazenadas em tubos plásticos e congelados em nitrogênio líquido. Após a coleta, o material foi armazenado em ultra-freezer -80°C até seu processamento.

O sangue coletado foi, posteriormente, centrifugado a 3000 G por 15 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (NT 805 Nova Técnica Ind. e Com. Equipamentos de laboratório Ltda. Piracicaba-SP Brasil) e o soro foi estocado para análises endócrinas posteriores.

4.7 Métodos de quantificação hormonal, biologia molecular (in vitro)

4.7.1 ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme -Linked Immunodorbent Assay – ELISA*) é uma técnica que utiliza o sistema imunoenzimático através da reação entre o anticorpo e o antígeno. É um método que permite a identificação de proteínas, peptídeos, anticorpos e hormônios. Para isso, utiliza-se uma placa que possui o anticorpo específico para o antígeno a ser avaliado.

Este ensaio em questão é baseado na competição entre a testosterona e o conjugado testosterona-acetilcolinesterase (AChE) por uma quantidade limitada de antissoro de testosterona, a fim de determinar os níveis plasmáticos desse esteroide. Como a concentração do conjugado AChE é mantida constante e os níveis de testosterona variam, a quantidade de AChE que será capaz de se ligar ao antissoro de testosterona na placa será inversamente proporcional à concentração de testosterona no poço. O que quer dizer que quanto mais testosterona presente na amostra, menos AChE se ligará aos anticorpos presentes nos poços da placa. Posteriormente, a placa é lavada para retirar

quaisquer reagentes que não tenham se ligado ao poço. Após a lavagem, é adicionado o reagente para a ocorrência da reação enzimática (**Figura 20**). A reação enzimática deste ensaio é amarela e sua absorbância é mensurada a 412 nm.

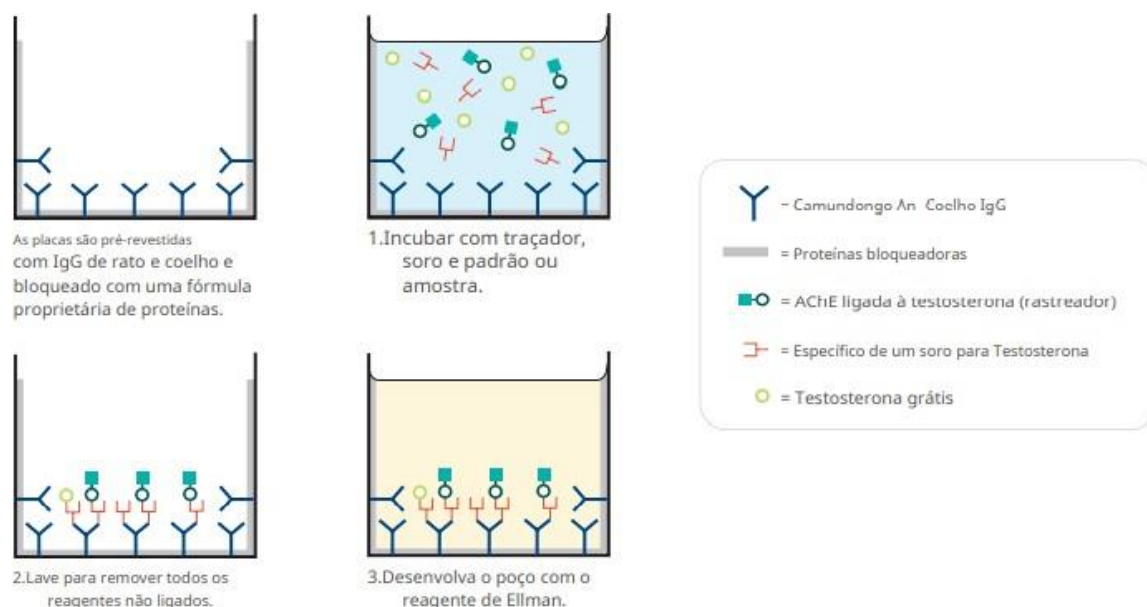


Figura 20. Esquema do processo de dosagem de testosterona por ELISA (imagem retirada do manual do fabricante)

O protocolo foi realizado conforme as orientações do fabricante (*Cayman Chemical, Michigan, USA*). Inicialmente, as amostras, previamente centrifugadas para separação do plasma sanguíneo e estocadas em -80°C , foram colocadas em gelo. Como o plasma possui outros esteroides que podem interferir com o ensaio, foi necessário fazer a extração e purificação da testosterona. Dessa forma, foram aliqüotados $400\ \mu\text{L}$ de plasma em um tubo estéril e adicionado $2\ \text{mL}$ de éter dietílico ($5\times$ o volume), sendo, posteriormente, agitados em vórtex para a formação das duas fases. Noventa por cento do conteúdo foi transferido para um novo tubo estéril e todo o processo foi repetido novamente por 5 vezes. Ao final do processo de extração, o tubo que continha os extratos de éter foi colocado para evaporar em uma corrente suave de nitrogênio. Após a secagem, o extrato foi dissolvido em $0,5\ \mu\text{L}$ de tampão ELISA. Para estabelecer uma curva padrão, foi realizada diluições em série com concentrações conhecidas de testosterona ($500\ \text{pg/mL}$ à $3,9\ \text{pg/mL}$). A configuração da placa de 96 poços seguiu a seguinte organização: dois poços brancos, dois poços de ligação inespecífica, dois poços de ligação máxima e curva padrão de oito pontos em duplicata (**Figura 21**). Por sua vez, foram realizadas duas diluições para cada amostra, sendo cada diluição analisada em triplicata. Após a

configuração, a placa foi colocada em incubação por 2 horas em agitador orbital. Ao final da incubação, os poços foram esvaziados e lavados 5x com tampão de lavagem e reconstituído com reagente para geração de fluorescência. A placa foi novamente desenvolvida e incubada em agitador orbital por 90 minutos. Por fim, foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. Os valores de absorbância obtidos foram plotados em planilha fornecida pelo fabricante e os resultados analisados em software estatístico.

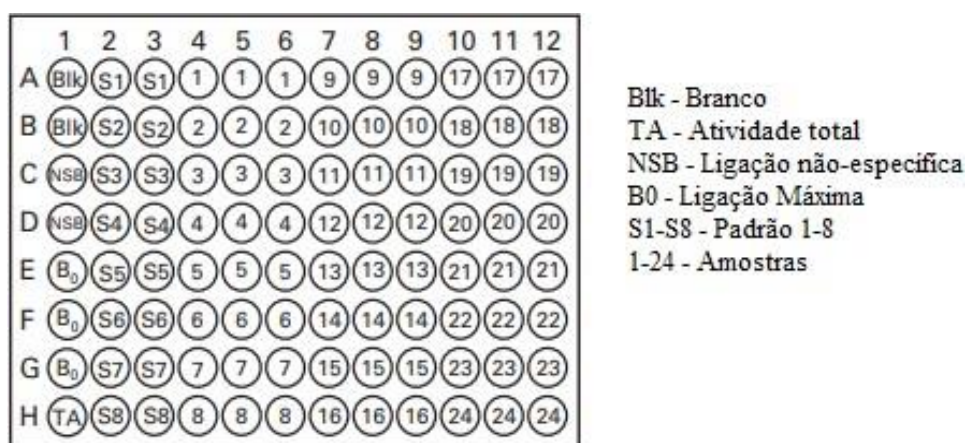


Figura 21. Formato da placa de amostras (imagem retirada do manual do fabricante)

4.7.2 Biologia molecular

4.7.2.1 Extração de RNA

Para a análise de expressão gênica da prole M e F do protocolo 1 foram utilizados 6 amostras de hipocampo de cada grupo. Para isso o tecido cerebral foi homogeneizado pela técnica do QIAzol Lysis Reagent® (Qiagen, Burlington, ON, Canada) utilizando 1ml do reagente para 50 mg de tecido. Após a completa homogeneização do tecido foi acrescentado 200 µL de clorofórmio sendo, posteriormente, fortemente agitados e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação, o material foi centrifugado à 12.000 rpm (força G), por 15 minutos, a 4 °C (centrífuga 5430® R eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Com a formação das 3 fases (sobrenadante: RNA; interfase: DNA; orgânica: proteínas), foi retirado 200 µL do sobrenadante, contendo o RNA total, e transportado para outro tubo RNase free. Ao sobrenadante foi adicionado 200 µL de isopropanol, com o objetivo de precipitar o RNA. Nesta etapa o material foi agitado por exposição a um vórtex e armazenado em -80 °C. Vinte e quatro horas após, o material foi descongelado e centrifugado 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4

°C. Após a formação do pellet de RNA, o sobrenadante foi removido por inversão e adicionou-se 950 µL de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado, dessa vez, à 7600 rpm, por 5 minutos à 4 °C. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi novamente removido e os tubos permaneceram por 1h na capela para secagem do pellet. Após o período de secagem, o pellet de RNA foi ressuspensionado em 20 µL de água RNase Free (água tratada com DEPC) e quantificado sua concentração em nanoespectrofotometro (DeNovix DS-11 Spectrophotometers, D.A.I. Scientific Equipament, USA).

4.7.2.2 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa, do inglês, *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR), é um aprimoramento técnico-científico da PCR convencional, sendo um importante método na quantificação da expressão gênica, podendo ser utilizado para diferentes tecidos e amostras biológicas (DE LADEIRA et al, 2011). Dessa forma, a PCR caracteriza-se como uma ferramenta em biologia molecular que contribui para amplificar regiões específicas de determinada sequência de DNA, que podem estar localizadas em misturas complexas, em quantidades suficientes para serem analisadas e quantificadas (OLIVEIRA, 2007). Desse modo, utilizamos a RT-qPCR para a quantificar a expressão do mRNA dos seguintes genes: *Gabra2*, *Gad1*, *Bdnf*, *Nrkb2*, *Hrt1a*, *Tph*, *Th*. As amostras foram diluídas, a fim de padronizar a concentração de RNA presente.

Posteriormente, utilizando o kit QuantiNova Reverse Transcriptase Kit (Quiagen, Burlington, ON, Canada) de acordo com as indicações do fabricante foi obtido o cDNA. Na primeira etapa as amostras foram tratadas para eliminação do DNA genômico. Para isso foram utilizados 2 µL de gDNA Removal Mix, 1 µL de Internal Control RNA, além de 12 µL da amostra de RNA com concentração padronizada anteriormente. A reação foi incubada durante 2min a 45°C em termociclador. Na segunda etapa foi realizada a transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA) num volume final de 20 µL. Para preparação do master mix, foram utilizados 1 µL da enzima Reverse Transcriptase e 4 µL Reverse Transcription mix para cada reação. Em seguida adicionou-se 5µl do Master Mix em cada tubo contendo os 15 µL da amostra de RNA previamente tratada e colocado no termociclador. As amostras foram incubadas por 3 minutos a 25°C, mais 10 minutos a 45°C e, por fim, 5 minutos a 85°C a fim de inativar a transcriptase reversa. Ao fim da reação, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

A expressão dos genes foi detectada pela utilização do fluoróforo intercalante Power Sybr Master Mix (Applied Technology Laboratories, Thermo Fischer Scientific - BR). Os primers utilizados foram sintetizados pela Exxtend Biotecnologia Ltda (São Paulo, BRA). Para determinar a eficiência dos primers foi feito uma curva de amplificação utilizando diferentes quantidades de cDNA (24 ng, 8 ng, 2,66 ng, 0,88 ng) de um pool obtido das amostras dos grupos experimentais. Todos os primers foram testados na concentração de 400 nM.

As amostras foram quantificadas em triplicata utilizando 5 ng de cDNA por reação. Em seguida, foi realizada a amplificação do fragmento correspondente ao RNAm do gene desejado, utilizando-se um aparelho de PCR *ViiA 7 Real Time PCR System* (ThermoFisher Scientific, USA) que possui um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. Dessa forma, o ciclo foi iniciado com a incubação a 50°C por 10 min e então a 95°C por 5 min (ativação da DNA polimerase). Após esta etapa inicial, 39 ciclos de PCR foram realizados. Cada ciclo consistiu no aquecimento das amostras por 95°C por 10s para permitir o processo de desnaturação e depois de 30s a 60°C para o anelamento e extensão. Os resultados foram analisados com base no valor de Cq (*quantification cycle* ou quantificação de ciclo), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, e expressos através dos valores comparativos (Δ) da expressão do gene alvo em relação ao gene controle (β -actina) segundo a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (CALABRESE ET AL. 2013). Os resultados foram avaliados através do software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (ThermoFisher Scientific Inc, USA). As sequências de primers utilizadas foram as seguintes:

Tabela 03. Sequência dos pares de primers utilizados

Gene	Primer forward	Primer reverse
<i>Actb</i>	ACGTTGACATCCGTAAAGACC'	GCCACCAATCCACACAGAGT
<i>CiclofilinaA</i>	GTCAACCCACCCGTGTTCTTC	ACTTGCCACCAGTGCCATTATG
<i>Gabra2</i>	TACAGTCCAAGCCGAATGTCC-	ACTGGCCCAGCAAATCATACTG
<i>Gad1</i>	GCGGGAGCGGATCCTAATA	TGGTGCATCCATGGGCTAC
<i>Bdnf</i>	GCCTTTGGAGCCTCCTCTAC	GCGGCATCCAGGTAATTTT
<i>Ntrk2</i>	GGTACTGTCAGGCACTGTGGAAC	TAGGTCACGGCTGGCGGAAG
<i>Tph2</i>	CATTCTCGCACAATTCCAGTCG	AGTCTACATCCATCCCAACTGCTG
<i>Htr1a</i>	GTGAGAGGAAGACAGTGAAGAC	CCGTGAGAGGAAGACAGTGAAGAC

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPrism versão 9.3 (La Jolla, EUA). A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnof. A homogeneidade de variância foi obtida pelo teste de Levene. A obtenção de $p > 0,05$ em ambos os testes constataram a normalidade dos dados, o que permitiu a realização de comparações paramétricas. O teste T-Student foi utilizado para a comparação dos grupos independentes demonstrados pelo valor da média \pm erro padrão. Por sua vez, o teste de Mann Whitney, foi utilizado para os dados não-paramétricos demonstrados pelo valor da média \pm erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. Não obstante, foi utilizado o teste de Grubbs para a verificação de valores *outliers*.

Os testes do labirinto de Barnes e esquiva passiva foram analisadas à partir do teste de Análise de Variância de duas vias (ANOVA Two-Way) por terem sido analisadas duas variáveis independentes: tempo e tratamento. No teste de interação social também foi utilizado o teste estatístico da ANOVA Two-Way.

5 RESULTADOS

PROTOCOLO 1

5.1 Testes de ansiedade e depressão (Prole M)

5.1.1 Campo aberto

Neste protocolo, pode-se ressaltar que a programação paterna com PT não alterou o perfil de exploração e o comportamento semelhante à ansiedade quando comparado ao grupo controle (**Figura 22**).

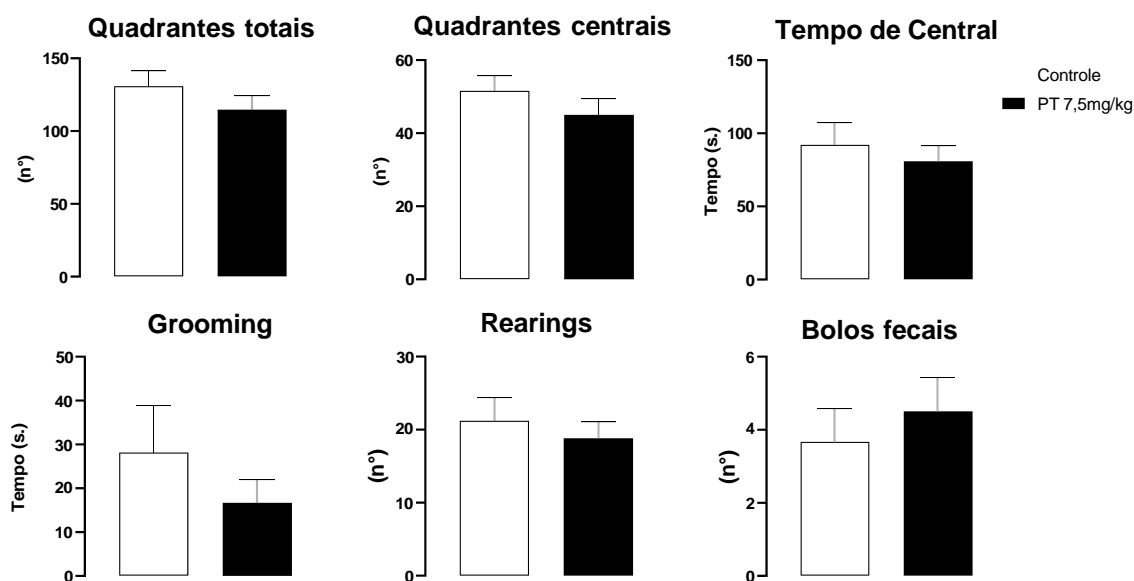


Figura 22: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do campo aberto em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$. Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=10

5.1.2 Caixa claro-escuro

Um dia após a tarefa de reconhecimento de objetos, os animais foram submetidos ao teste da caixa claro-escuro (**Figura 23**). Foi verificado que os animais de pais tratados com anabolizante tiveram alterações significativas nos seguintes parâmetros: aumento no tempo latência ($U(15) = 12; 48,11s. \pm 12,13$ vs. $142,6s. \pm 33,44; p = 0,019$) ($\uparrow 196\%$), redução no tempo de permanência no lado claro ($t(15) = 3,654; 74,56s. \pm 10,44$ vs. $29,63s. \pm 5,6; p = 0,002$) ($\downarrow 60,3\%$), transições ($U(15) = 6; 16,11 \pm 2,45$ vs. $6,37 \pm 1,33; p = 0,002$) ($\downarrow 60,4\%$) e rearings ($U(15) = 7,5; 9,33 \pm 2,09$ vs. $1,00 \pm 0,73; p = 0,004$) ($\downarrow 89,3\%$). Em conjunto, essas alterações indicam um evidente aumento do comportamento semelhante a ansiedade nos animais do grupo PT. No parâmetro de avaliação de risco (SAP), não foi verificado diferença significativa entre os grupos

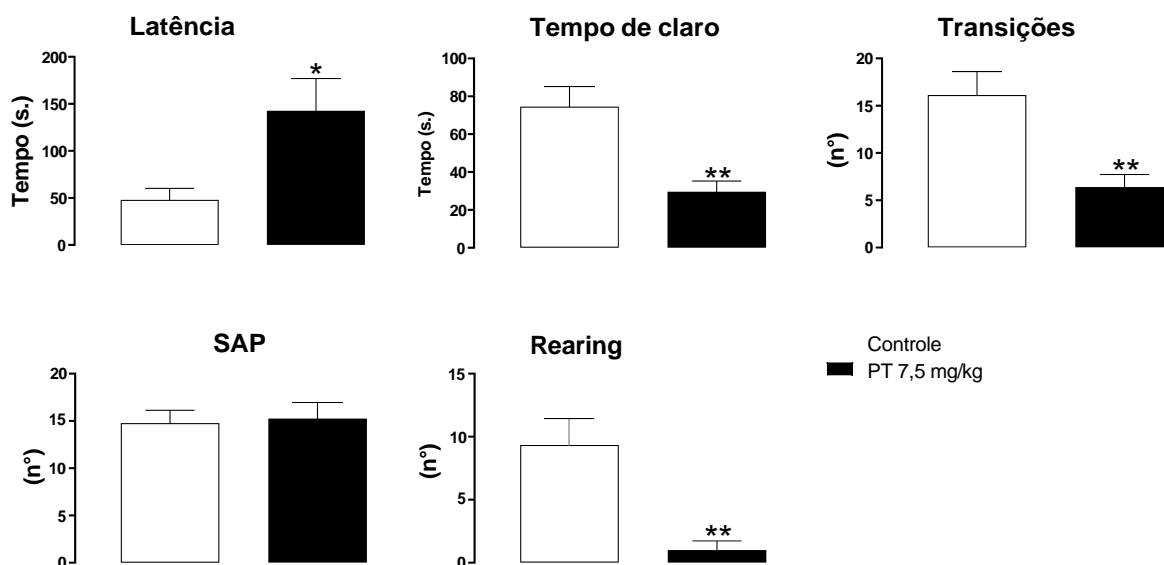


Figura 23: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da caixa claro-escuro em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. **Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=8**

5.1.3 Labirinto em cruz elevado

Os resultados deste teste demonstraram que a prole PT apresentou comportamento ansiogênico em relação ao grupo controle (**Figura 24**). Houve diminuição no tempo de permanência nos braços abertos ($U(15) = 14,50; 124,9s. \pm 9,55$ vs. $91,44s. \pm 7,93$, $p = 0,04$) ($\downarrow 26,8\%$) e aumento no tempo de permanência nos braços fechados ($t(15) = 3,061; 108,3s. \pm 5,82$ vs. $159,3s. \pm 14,81$; $p = 0,01$) ($\uparrow 47,1\%$) com diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Os demais parâmetros que foram analisados não apresentaram diferenças significativas.

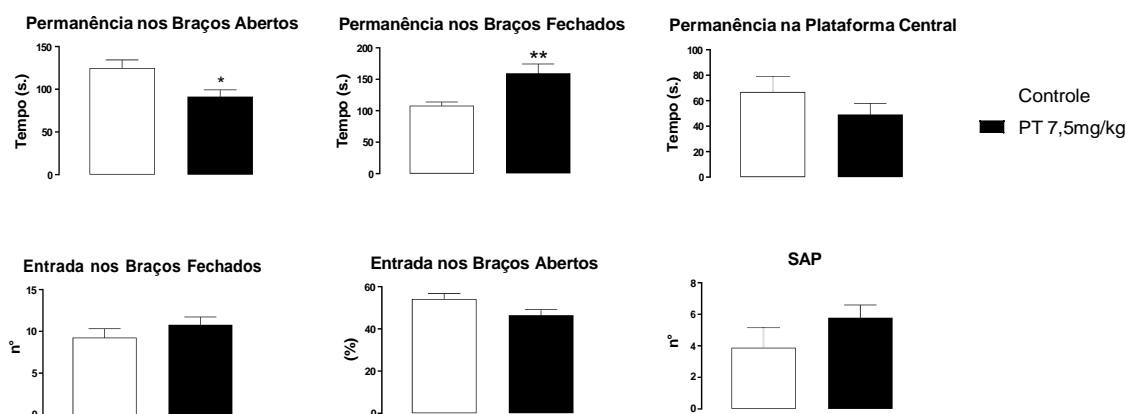


Figura 24: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do LCE em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. **Controle N= 8, PT 7,5 mg/kg: N=9**

5.1.4 Suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda, a prole PT teve uma redução significativa no tempo de imobilidade quando comparada ao controle ($t(17) = 2,507$; $145,0 \text{ s.} \pm 10,74$ vs. $104,5 \text{ s.} \pm 11,88$; $p = 0,02$) ($\downarrow 28\%$) (**Figura 25**). Todavia, no parâmetro de latência não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais.

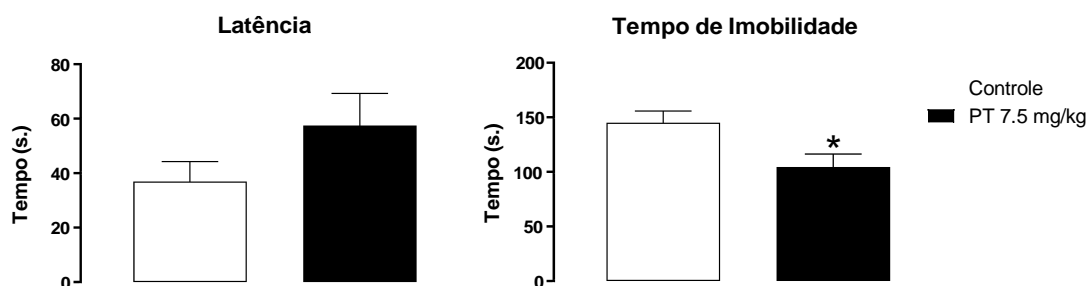


Figura 25: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda em prole de camundongos machos cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0.05$. Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=10

5.2 Memória (Prole M)

Reconhecimento de objetos – 6 h

No teste de reconhecimento de objetos, não foi verificada nenhuma diferença significativa nos índices de discriminação absoluto e relativo (**Figura 26**)

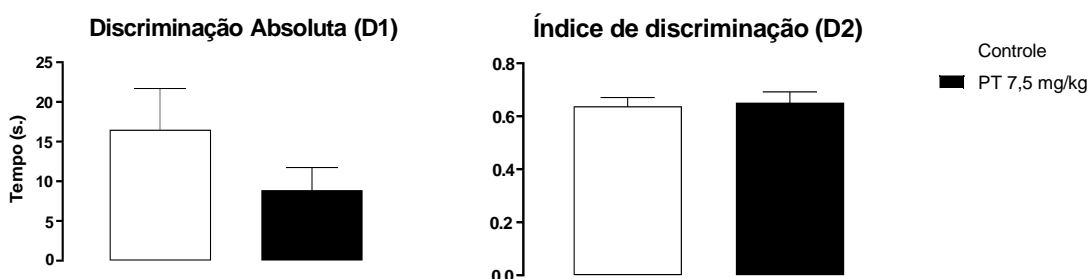


Figura 26: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de Objetos de 6h em prole de camundongos machos cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. Controle N= 8, PT 7,5 mg/kg: N=8

5.3 Expressão gênica (Prole M)

De acordo com os resultados, não houve diferenças significativas na expressão dos genes relacionados com o sistema serotoninérgico, tais como: *Tph2* (triptofano hidroxilase 2 - TPH2) e o *Hrt1a* (receptor 5HT1a). Em relação ao sistema

monoaminérgico, também não verificamos diferença significativa na expressão gênica da principal enzima responsável pela síntese de monoaminas, *Th* (tirosina hidroxilase – TH) (**Figura 27**)

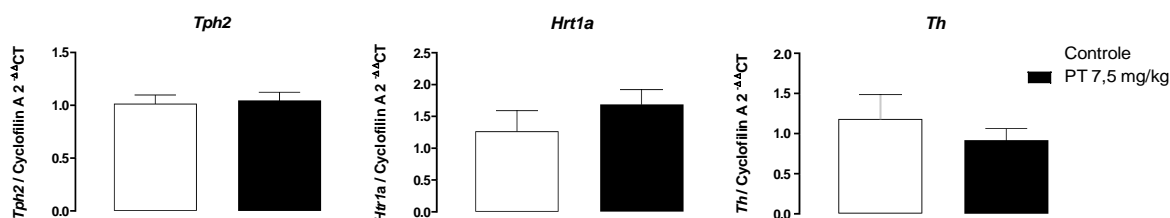


Figura 27: Avaliação da expressão dos genes *Tph2*, *Hrt1a* e *Th*, relacionados com o sistema serotoninérgico e monoaminérgico na região do hipocampo em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. **Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=6**

Avaliamos também a expressão de neurotrofinas, que são fatores envolvidos na proliferação, maturação e orientação de neurônios durante o desenvolvimento, assim como na sobrevivência neuronal, na região do hipocampo. Não visualizamos diferença significativa na expressão do gene *Bdnf*, nem no seu receptor *Ntrk2* (TrkB) (**Figura 28**).

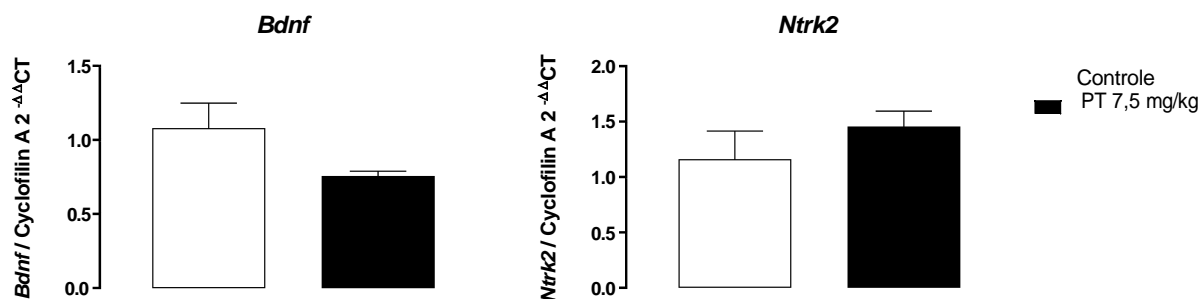


Figura 28: Avaliação da expressão dos genes *Bdnf* e *Ntrk2* na região do hipocampo em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. **Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=5**

Entretanto, no que concerne ao sistema foi verificado que a prole PT teve uma redução significativa na expressão hipocampal de *Gad1* (GAD 67) ($t(10) = 2,884$; $1,01 \pm 0,06$ vs. $0,83 \pm 0,02$, $p = 0,02$) ($\downarrow 17\%$), acompanhada de uma supra regulação do gene *Gabra2* (subunidade $\alpha 2$ do receptor GABA_A) ($t(10) = 2,382$; $1,05 \pm 0,15$ vs. $1,50 \pm 0,12$, $p = 0,04$) ($\uparrow 42,8\%$) (**Figura 29**).

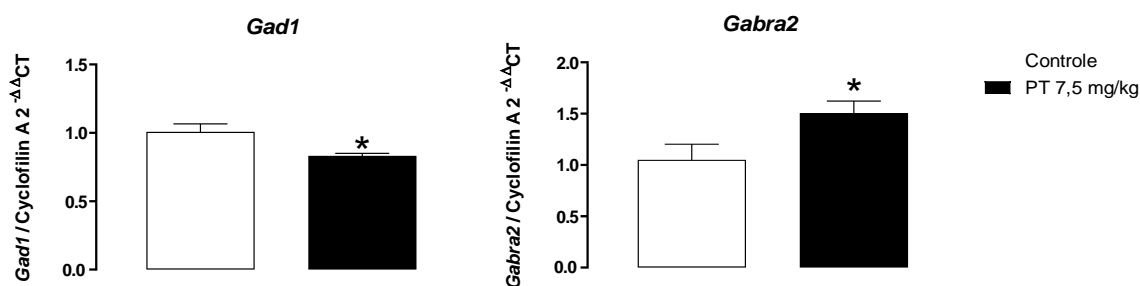


Figura 29: Avaliação da expressão de genes relacionados com sistema GABAérgico, *Gad1* e *Gabra2* na região do hipocampo em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. * representa $p < 0,05$. Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=6

5.4 Testes de ansiedade e depressão (Prole F)

5.4.1 Campo aberto

No teste de Campo Aberto, realizado com a prole de fêmeas dos pais submetidos ao tratamento com PT, não observamos alteração na atividade locomotora entre os grupos experimentais, demonstrando que não há déficit na atividade locomotora espontânea entre os grupos. Também não foram verificadas diferenças significativas nas variáveis relacionadas com o comportamento semelhante à ansiedade e à responsividade ao estresse. Porém, houve diferença significativa com redução no número de rearings ($t(18) = 2,430; 22,27 \pm 2,72$ vs. $13,44 \pm 2,24; p=0,03$) ($\downarrow 39,6\%$), assim como um aumento no número de bolos fecais ($t(18) = 2,712; 2,54 \pm 0,37$ vs. $4,6 \pm 0,69; p=0,03$) ($\uparrow 81,1\%$) (Figura 30).

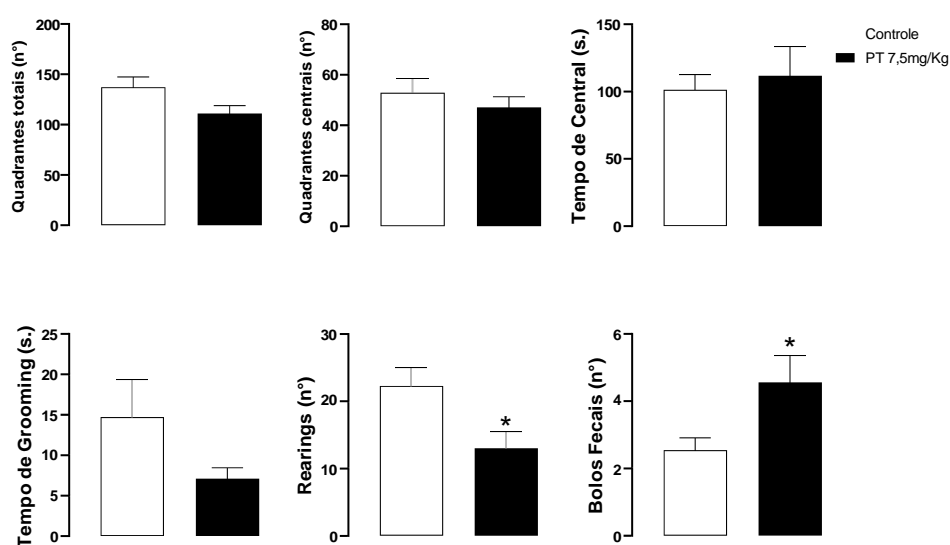


Figura 30: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do Campo Aberto em prole de camundongos fêmeas, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$. Controle N= 11, PT 7,5 mg/kg: N=9

5.4.2 Caixa claro-escuro

Um dia após a tarefa de reconhecimento de objetos, as fêmeas foram submetidas ao teste da caixa claro-escuro. Foi verificado que as fêmeas PT não tiveram alterações significativas nos parâmetros analisados neste teste, o que demonstra que não houve alterações no comportamento análogo à ansiedade neste teste (**Figura 31**).

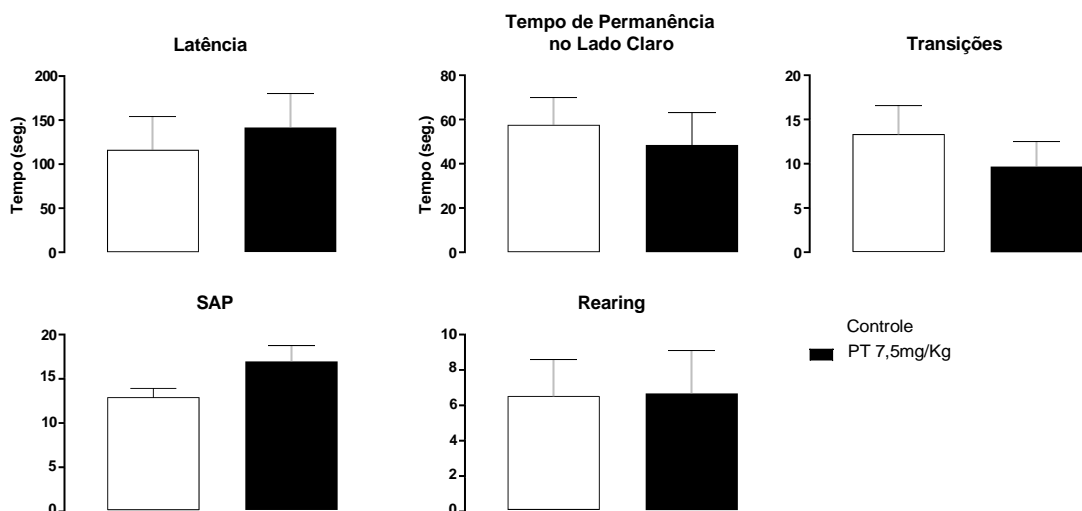


Figura 31: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da Caixa claro-escuro em prole de camundongos fêmeas, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=10**

5.4.3 Labirinto em cruz elevado

As fêmeas também foram submetidas ao LCE um dia após a CCE. Neste teste, verificamos aumento significativo no número de SAPs entre os grupos experimentais (U (17) = 14,5; 5,11 ± 1,44 vs. 10,7 ± 1,42; p=0,01) (↑109,4%). Nas demais variáveis não foi verificada diferença significativa entre os grupos (**Figura 32**).

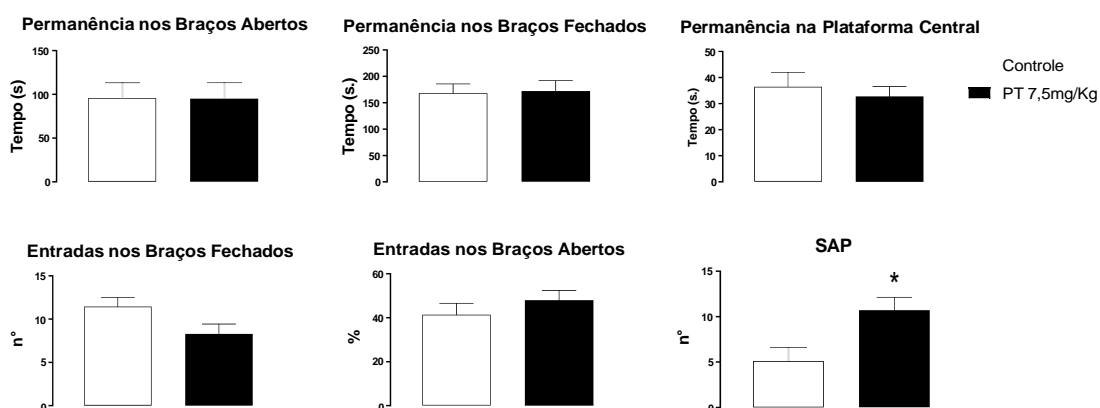


Figura 32: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado em prole de camundongos fêmeas, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa p < 0,05. **Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=10**

5.4.4 Suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda não foi verificada diferença significativa na latência para o primeiro episódio de imobilidade entre os grupos. Porém, foi observada uma redução no tempo de imobilidade do grupo PT em relação ao controle ($t(17) = 2,217$; $154,9s. \pm 14,61$ vs. $103,7s. \pm 18,19$, $p=0,04$) ($\downarrow 33,1\%$) (**Figura 33**).

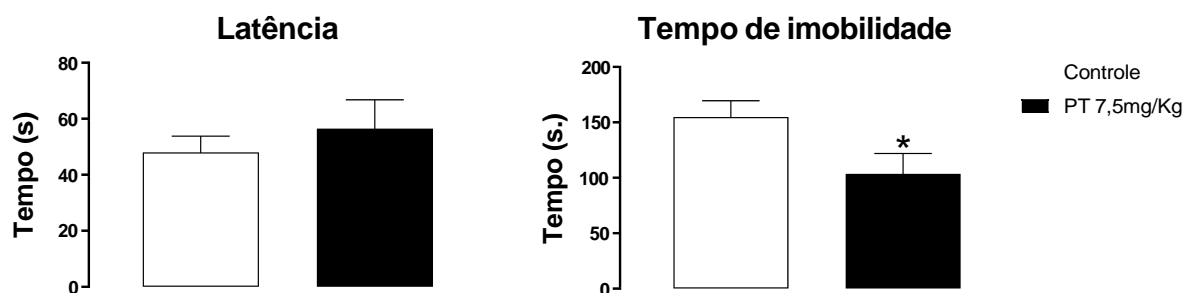


Figura 33: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de suspensão pela cauda em prole de camundongos fêmeas cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0.05$. **Controle N= 10, PT 7,5 mg/kg: N=9**

5.5 Memória (Prole F)

Reconhecimento de objetos - 6 h

No teste de reconhecimento de objetos não foi verificada diferença significativa na discriminação absoluta (D1), porém verificamos redução significativa no índice de discriminação relativo ($t(17) = 2,361$; $0,74 \pm 0,02$ vs. $0,67 \pm 0,02$; $p=0,03$) ($\downarrow 9,5\%$) (**Figura 34**).

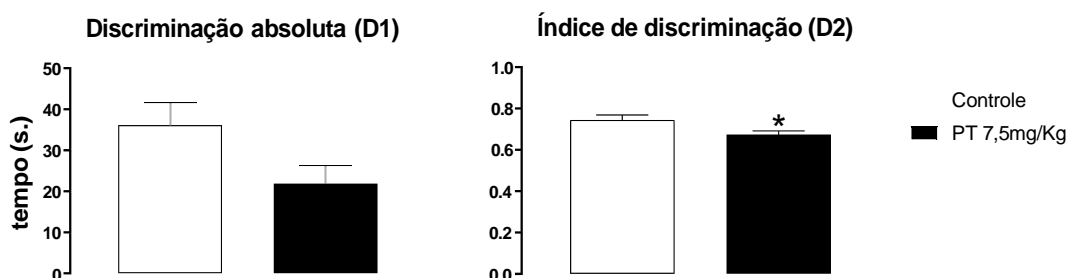


Figura 34: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de Objetos de 6h em prole de camundongos fêmeas cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 05.05$. **Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=9**

5.6 Expressão gênica (Prole F)

De acordo com os resultados, não houve diferenças significativas na expressão dos genes relacionados com o sistema serotoninérgico. Em relação ao sistema monoaminérgico, não verificamos diferença significativa na expressão gênica da principal enzima responsável pela síntese de monoaminas, a tirosina hidroxilase (*Th*), no hipocampo (**Figura 35**)

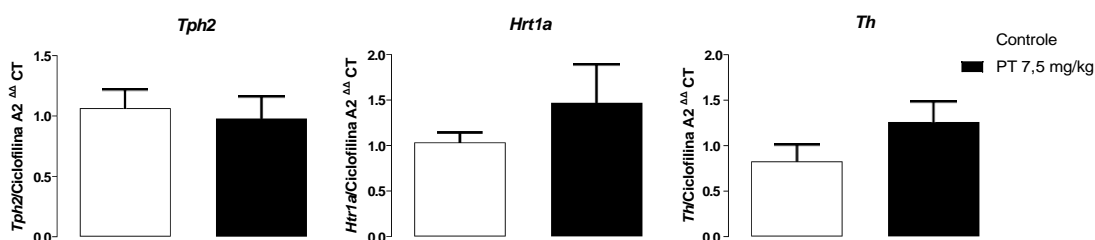


Figura 35: Avaliação da expressão dos genes *Tph2*, *Hrt1a* e *Th* relacionados com o sistema serotoninérgico e monoaminérgico na região do hipocampo em prole de camundongos fêmeas, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. **Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=6**

Avaliamos a expressão do *Bdnf*, uma importante neurotrofina presente no cérebro. Também não verificamos diferença significativa na sua expressão, nem no seu receptor *Ntrk2* (**Figura 36**)

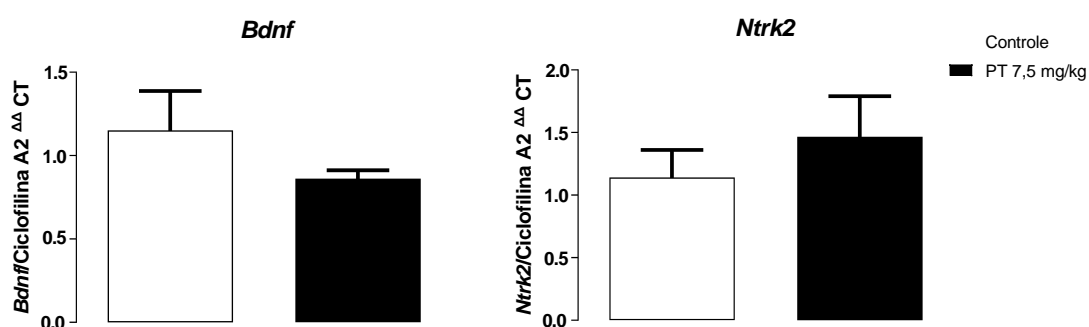


Figura 36: Avaliação da expressão dos genes *Bdnf* e *Ntrk2* em prole de camundongos fêmeas na região do hipocampo, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. **Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=6**

No que diz respeito ao sistema gabaérgico, também não foi verificada diferença significativa na expressão gênica da enzima *Gad1*, nem do gene *Gabra2* (**Figura 37**)

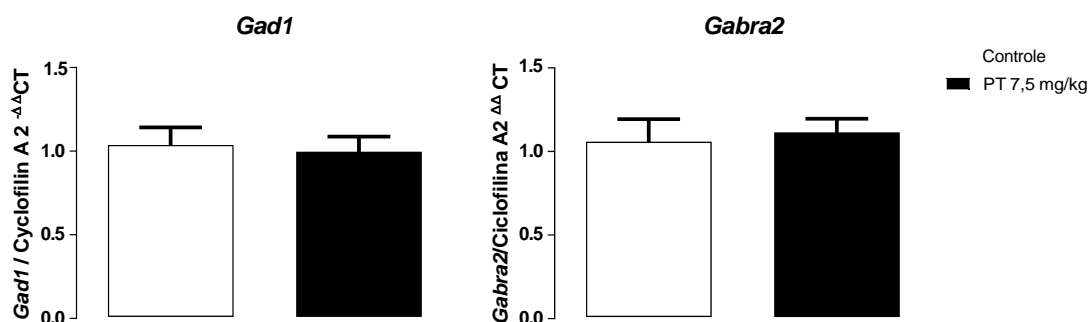


Figura 37: Avaliação da expressão de genes relacionados com sistema GABAérgico, *Gad1* e *Gabra2*, em prole de camundongos fêmeas no hipocampo, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal. * representa $p < 0,05$. Controle N= 6, PT 7,5 mg/kg: N=6

PROTOCOLO 2

5.7 Teste de ansiedade e depressão (pai)

5.7.1 Campo aberto

No teste de campo aberto, foi verificado que o tratamento com PT não alterou nenhum dos parâmetros analisados (**Figura 38**).

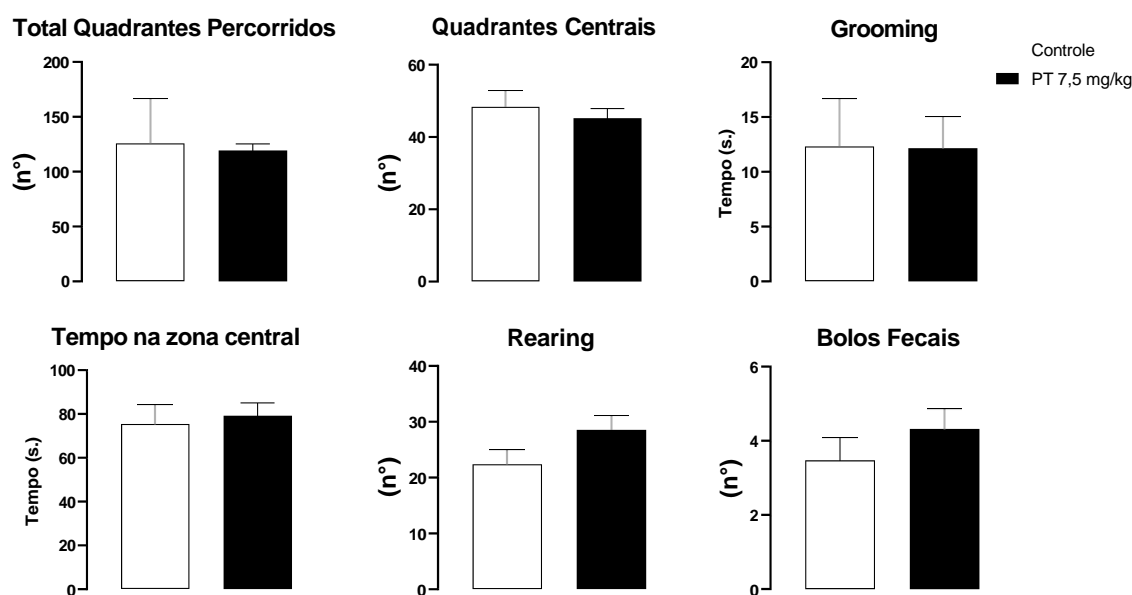


Figura 38: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de campo aberto em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. Controle N= 22, PT 7,5 mg/kg: N=25

5.7.2 Caixa claro-escuro

Assim como no teste do campo aberto, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados (**Figura 39**)

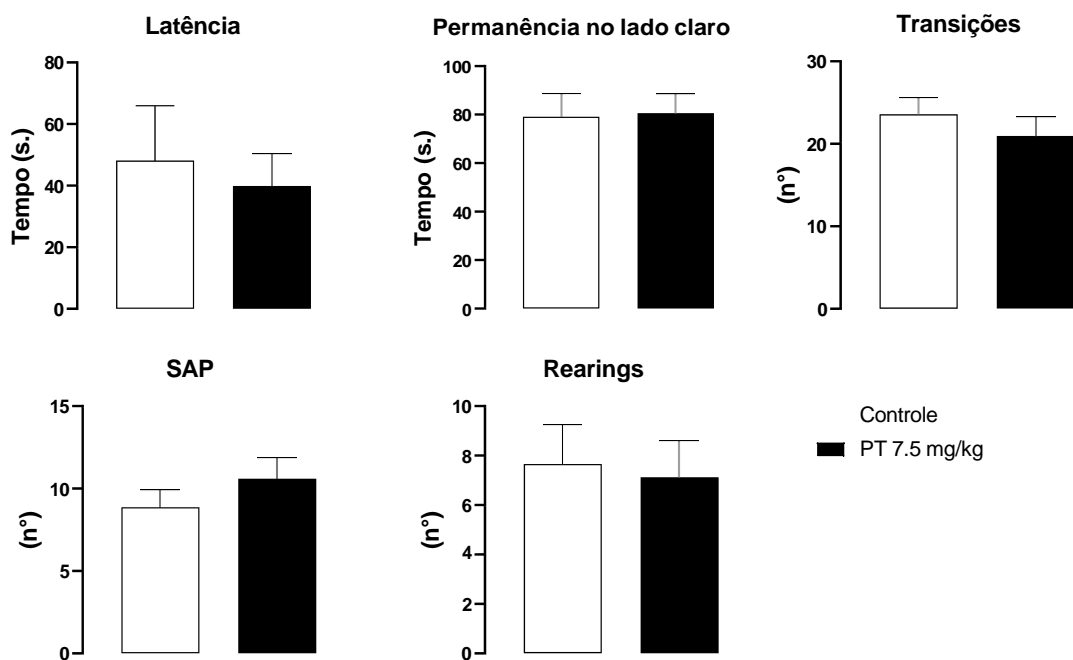


Figura 39: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste da Caixa claro-escuro em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25**

5.7.3 Labirinto em cruz elevado

No teste do LCE, também utilizado para avaliar os comportamentos análogos à ansiedade, não foram verificadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados (**Figura 40**)

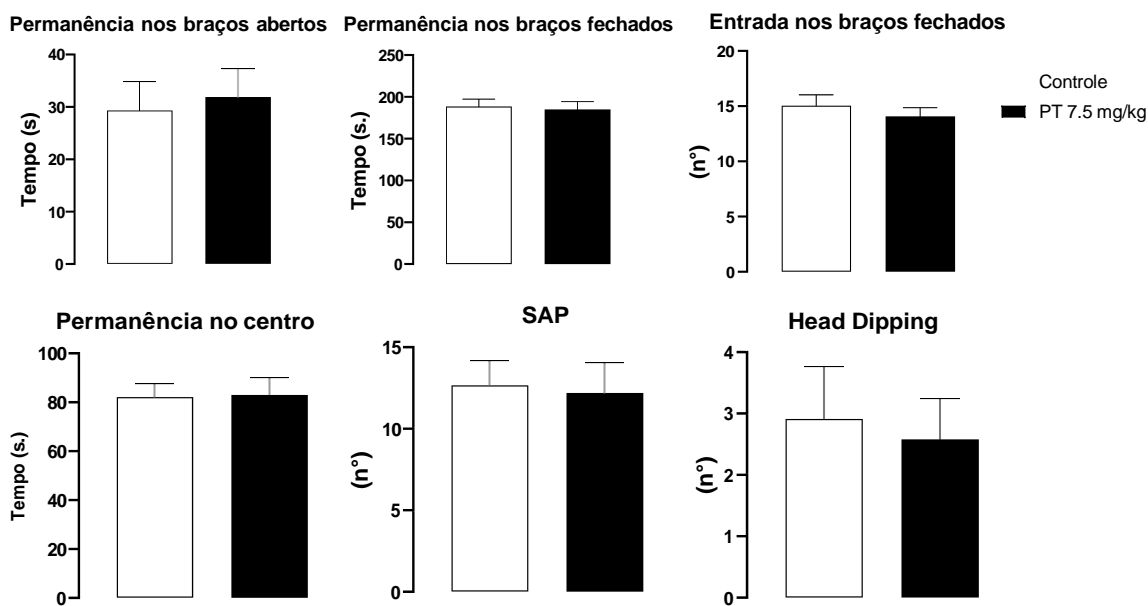


Figura 40: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste do Labirinto em cruz elevado em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25**

5.7.4 Suspensão pela cauda

Este teste teve como objetivo avaliar os comportamentos análogos à depressão, principalmente, no que diz respeito aos comportamentos de desespero, comum em indivíduos com depressão. foi verificada diferença significativa no tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade ($t(36) = 2,049$; $130,5s. \pm 17,99$ vs. $90,05s. \pm 8,14$; $p=0,04$) ($\downarrow 31\%$), porém não foi verificada diferença significativa no principal parâmetro do teste que é o tempo de imobilidade (**Figura 41**)

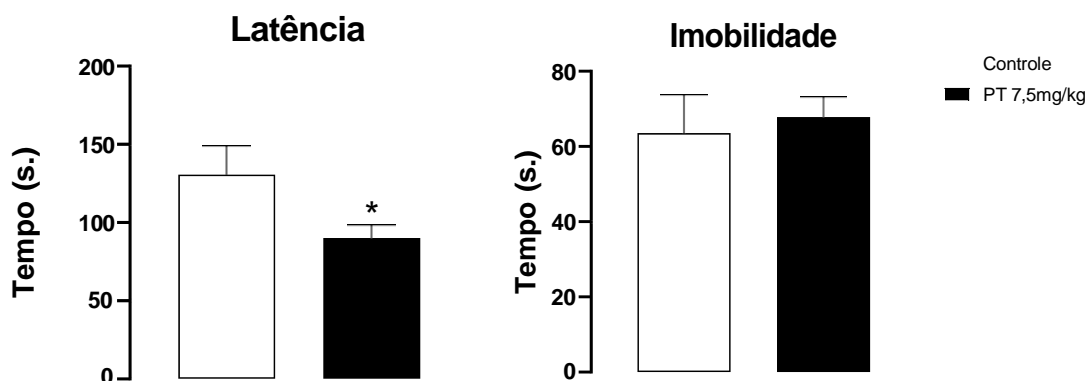


Figura 41: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Suspensão pela cauda em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$. **Controle N= 19, PT 7,5 mg/kg: N=19**

5.8 Memória (pai)

Reconhecimento de objetos - 6 h

Neste teste, buscamos avaliar a memória dos animais. Inicialmente, realizamos a exposição inicial a dois objetos iguais. Verificamos redução significativa no tempo de discriminação absoluta (d1) ($t(46) = 2,563$; $26,57s. \pm 2,76$ vs. $15,92s. \pm 3,07$; $p=0,01$) ($\downarrow 40,1\%$); no índice de discriminação absoluto (d2) ($t(46) = 3,071$; $0,55 \pm 0,04$ vs. $0,34 \pm 0,06$; $p=0,004$) ($\downarrow 38,2\%$) e no índice de discriminação relativa (d3) ($t(46) = 3,109$; $77,56 \pm 1,88$ vs. $66,60 \pm 2,91$; $p=0,003$) ($\downarrow 14,1\%$) (**Figura 42**).

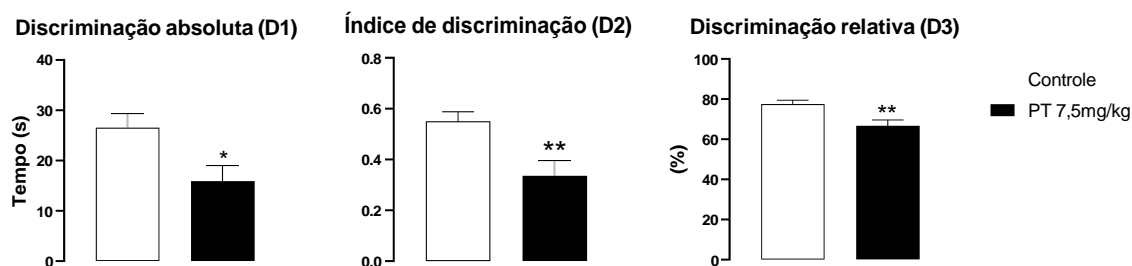


Figura 42: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de objetos em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$. **Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25**

5.9 Sociabilidade e preferência social (pai)

O primeiro momento do teste de Interação Social é definido como sociabilidade em que foram avaliados o tempo de interação com o estímulo social (S) e não-social (NS). É comum o animal interagir mais tempo com um coespecífico, em detrimento da interação com a gaiola vazia. Portanto, uma redução, assim como a ausência de diferença na interação, pode sugerir uma menor capacidade de sociabilidade desses animais.

Como pode ser observado ambos os grupos tiveram preferência em interagir mais com o estímulo social em comparação ao estímulo não-social. Porém, não houve diferença significativa no tempo de interação com o estímulo social entre os grupos experimentais (**tabela 4**). Por outro lado, verificamos redução significativa no índice de preferência social entre os grupos ($U(46) = 184; 0,87 \pm 0,02$ vs. $0,77 \pm 0,04; p = 0,03$) ($\downarrow 8,3\%$) (**Figura 43**).

Tabela 4. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade.

	Dias	Média (s.)		Média (s.)
Controle	Não Social (NS)	14,96 ± 2,59	Social (S)	111,2 ± 13,91
PT 7.5 mg/kg	Não Social (NS)	23,00 ± 3,69	Social (S)	95,28 ± 12,91

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 92) = 1,508	P = 0,2226
Sociabilidade	F (1, 92) = 74,72	P < 0,0001
Tratamento	F (1, 92) = 0,1622	P = 0,6881

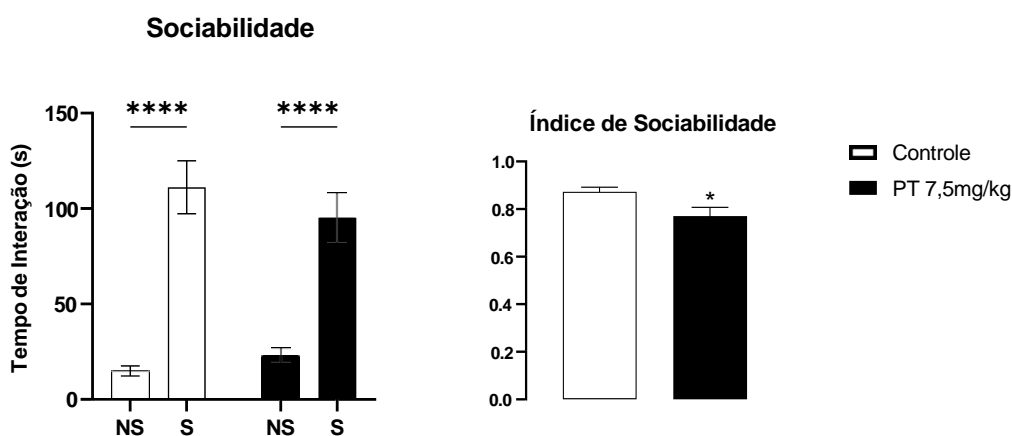


Figura 43: Avaliação do tempo de interação com o estímulo não-social (NS) e o estímulo social (S), na etapa de Sociabilidade, em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. * representa $p < 0,05$, **** $< 0,0001$.

Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25

O segundo momento do teste é conhecido como novidade social. Nesta etapa, um novo animal é colocado dentro da gaiola que se encontrava vazia anteriormente. Dessa forma, pode ser avaliado a preferência à novidade social dos animais, assim como a memória social (normalmente, o animal permanece mais tempo com o novo estímulo social). A falta de interação com o novo coespecífico pode sugerir um prejuízo de interação social, assim como uma memória social, possivelmente, prejudicada.

Não foi observado diferença significativa entre os animais tratados com PT e o grupo controle no tempo de interação com o animal familiar comparado à novidade social (tabela 5). Também não houve diferença significativa no tempo de interação com o animal desconhecido entre os grupos experimentais (Figura 44). Além disso, não foi observado diferença significativa no índice de novidade social.

Tabela 5. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo familiar e o estímulo de novidade na etapa de Preferência Social

		Média (s.)		Média (s.)
Controle	Familiar (F)	42,26 ± 5,79	Novidade (F)	54,48 ± 8,18
PT 7.5 mg/kg	Familiar (F)	53,00 ± 7,68	Novidade (F)	77,84 ± 9,46

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 92) = 0,6274	P=0,4304
Preferência Social	F (1, 92) = 5,407	P=0,0223
Tratamento	F (1, 92) = 4,579	P=0,0350

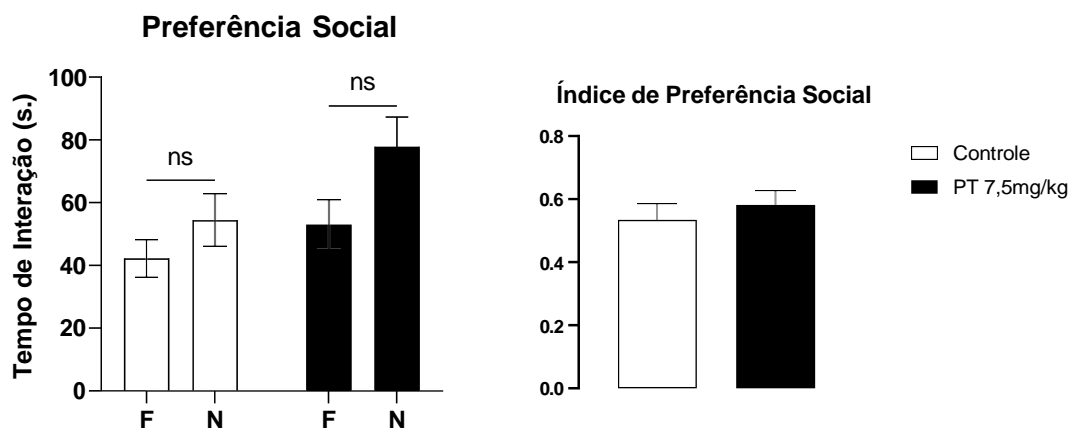


Figura 44: Avaliação do tempo de interação com o estímulo social familiar (F) e o estímulo de novidade social (N), na etapa de Preferência Social, em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. **Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25**

5.10 Agressividade (pai)

Intruso residente

Após 2 horas de ambientação do animal teste ao aparato (residente), a fim de estimular a territorialidade, um coespecífico intruso foi colocado no ambiente. Deste modo, foi verificado o nível de agressividade do residente. Verificamos diferença significativa nos principais parâmetros referentes à agressividade: latência para o 1º ataque (U (44) = 0,842; $241,1s \pm 33,74$ vs. $79,65s \pm 16,04$; $p=0,0001$) ($\downarrow 67\%$); número de ataques (U (44) = 153,5; $7,4 \pm 1,39$ vs. $13,6 \pm 2,02$; $p=0,014$) ($\uparrow 83,8\%$); tempo de luta (U (44) = 96; $10,61s \pm 1,97$ vs. $25,30s \pm 3,47$; $p=0,0001$) ($\uparrow 138,5\%$); perseguição (U (44) = 166; $8,0s \pm 2,19$ vs. $15,1s \pm 3,24$; $p=0,03$) ($\uparrow 88,8\%$) (**Figura 45**).

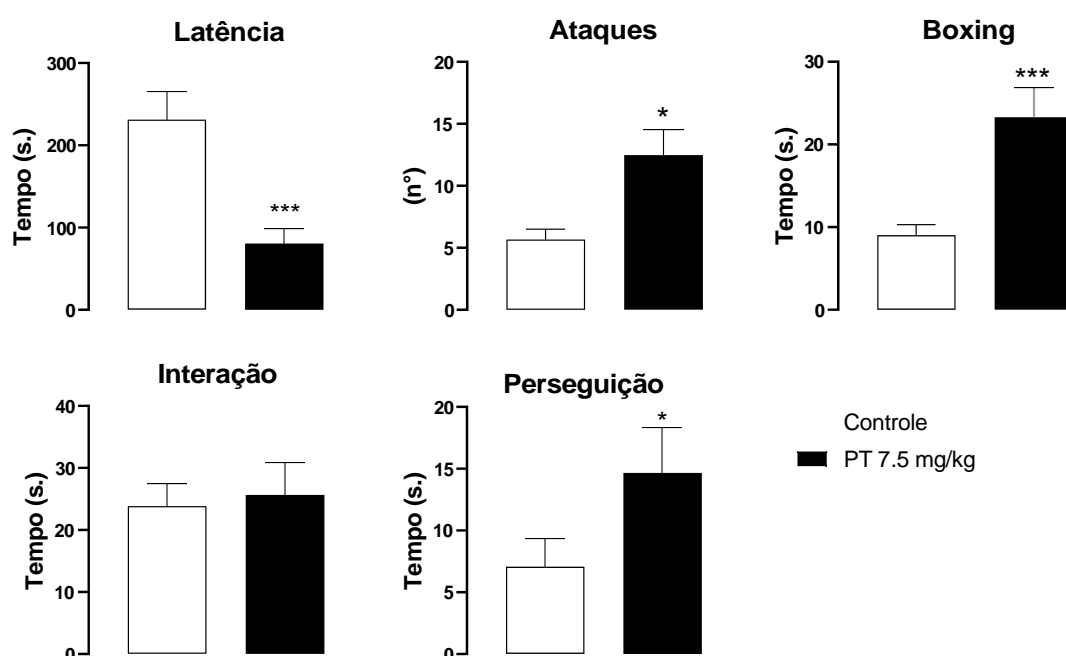


Figura 45: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste Intruso residente em camundongos machos submetidos ao tratamento com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 180 segundos. * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Controle N= 23, PT 7,5 mg/kg: N=25

5.11 Massa corporal, testicular e níveis plasmáticos de PT (pai)

Avaliamos se a massa corporal do animal seria alterada devido ao tratamento. No que tange a essa variável experimental, verificamos que, apesar de haver diferença da massa corporal inicial e final, não houve diferença significativa entre os grupos, demonstrando que o tratamento com PT não foi capaz modificar significativamente a massa corporal do animal (**Figura 46**)

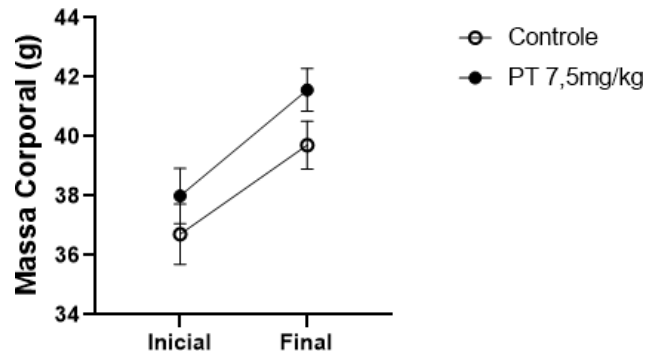


Figura 46: Avaliação da evolução da massa corporal nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo. **Controle N= 7, PT 7,5 mg/kg: N=7**

Tabela 6. Resultados da ANOVA Two-Way referentes a evolução da massa corporal nos pais submetidos ao tratamento com PT

Grupos	Massa Corporal I (g)	Massa Corporal F (g)
Controle	36,71 ± 1,02	39,71 ± 0,81
PT 7,5 mg/kg	38,00 ± 0,93	41,57 ± 0,72

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 24) = 0,1067	P=0,7468
Massa Corporal	F (1, 24) = 14,11	P=0,0010
Tratamento	F (1, 24) = 3,227	P=0,0850

Verificamos também se o tratamento com PT seria capaz de alterar a massa testicular dos animais. Neste parâmetro, foi evidenciada diminuição significativa entre os grupos ($t(12) = 2,313$; $0,22g \pm 0,02$ vs. $0,16g \pm 0,02$, $p=0,04$) ($\downarrow 27,3\%$). Também foi realizada a correção da massa testicular pela massa corporal (massa testicular / massa corporal*100). Foi verificado redução significativa do índice testicular entre os grupos ($t(12) = 3,012$; $0,54 \pm 0,03$ vs. $0,038 \pm 0,04$, $p=0,01$) ($\downarrow 29,6\%$) (**Figura 47**).

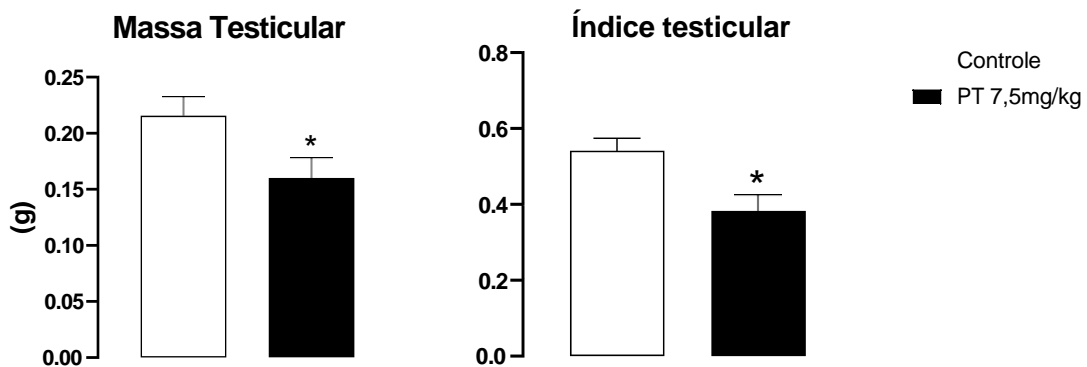


Figura 47: Avaliação da massa testicular e do índice testicular nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo. **Controle N= 7, PT 7,5 mg/kg: N=7**

Por sua vez, não foi encontrada diferença significativa nos níveis plasmáticos de testosterona entre os grupos experimentais (**Figura 48**)

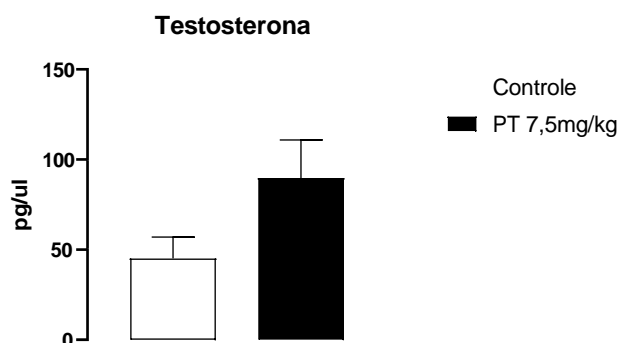


Figura 48: Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona nos pais submetidos ao tratamento com PT ou veículo. **Controle N= 4, PT 7,5 mg/kg: N=6**

5.12 Memória (Prole M)

5.12.1 Reconhecimento de objetos - 24 h

Vinte e quatro horas após a exposição aos objetos familiares, o teste foi novamente realizado e, dessa vez, foi verificada diferença significativa no tempo de discriminação absoluto (D1) entre os grupos ($U(19) = 15; 8,91 \pm 2,34$ vs. $-1,1 \pm 2,1$, $p=0,003$) ($\downarrow 87,7\%$). Verificamos também diferença significativa com redução no índice de discriminação absoluto (D2) ($t(19) = 2,596; 0,21 \pm 0,05$ vs. $-0,02 \pm 0,07$; $p=0,02$) ($\downarrow 90,5\%$), assim como no índice de discriminação relativo (D3) ($t(19) = 2,591; 60,45\% \pm 2,62$ vs. $48,95\% \pm 3,65$; $p=0,02$) ($\downarrow 19\%$) (**Figura 49**).

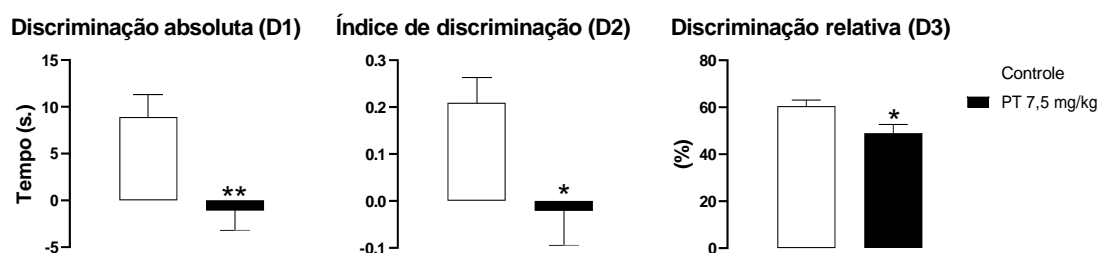


Figura 49: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de Objetos de 24h em prole de camundongos machos, cujos pais machos foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado à partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. * representa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **Controle N= 11, PT 7,5 mg/kg: N=10**

5.12.2 Labirinto de Barnes

A figura abaixo demonstra a evolução do aprendizado após 5 dias de treinamento, conhecido como o período de aquisição da memória. A evolução do aprendizado é resultado da redução da latência para encontrar o esconderijo. Como pode ser percebido, ambos os grupos conseguiram aprender onde o esconderijo estava,

porém sem diferença significativa entre os grupos, conforme a tabela e o gráfico apresentados abaixo (**Figura 50**)

O 6° dia do teste foi utilizado para verificar o tempo de latência para a entrada no esconderijo, porém não foi verificada diferença significativa entre os grupos experimentais. Os resultados sugerem que a memória espacial não foi afetada pela programação paterna com anabolizante.

Tabela 07. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao período de treinamento para a aquisição de memória no teste de Barnes Maze.

	Controle	PT 7.5 mg/kg
Dias	Média (s.)	Média (s.)
1	91,3 ± 24,9	83,0 ± 26,0
2	68,1 ± 20,2	86,4 ± 21,5
3	43,0 ± 18,0	71,0 ± 16,4
4	53,8 ± 18,4	58,9 ± 14,4
5	82,8 ± 15,4	57,2 ± 17,2
6	21,9 ± 4,75	53,4 ± 12,6

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (5, 102) = 0,7281	P=0,6039
Tempo	F (5, 102) = 1,835	P=0,1126
Tratamento	F (1, 102) = 0,5922	P=0,4433

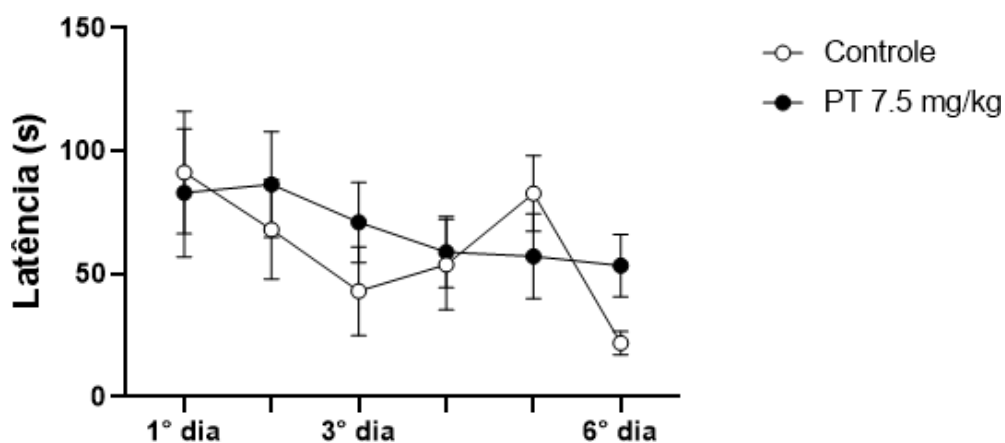


Figura 50: Linha temporal de aprendizado referente a latência para o animal encontrar o esconderijo, em prole de camundongos machos cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 10, PT 7,5mg/kg: N=11**

5.12.3 Esquiiva passiva

No teste de esquiiva passiva, de acordo com os resultados obtidos pelo teste ANOVA Two-Way, foi verificada diferença significativa no fator tempo, o que significa que os animais aprenderam a tarefa e, portanto, tiveram uma retenção da memória satisfatória após a exposição do estímulo aversivo. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas quanto ao tratamento e nem na interação entre as variáveis experimentais. Devido à falta de resultado significativo na variável interação (**Tabela 8**), os testes post-hoc não foram realizados.

Tabela 8. Resultados da ANOVA Two-Way referentes aos dias de aquisição e retenção de memória do teste Esquiiva-Passiva

	Controle	PT 7.5 mg/kg
Dias	Média (s.)	Média (s.)
Basal	8,4 ± 2,6	6,6 ± 0,9
24h	126,4 ± 24,2	114,6 ± 21,0
48h	79,5 ± 24,5	36,4 ± 16,7
72h	54,5 ± 21,6	31,1 ± 13,7

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (3, 72) = 0,4912	P=0,6895
Tempo	F (3, 72) = 13,98	P<0,0001
Tratamento	F (1, 72) = 2,482	P=0,1196

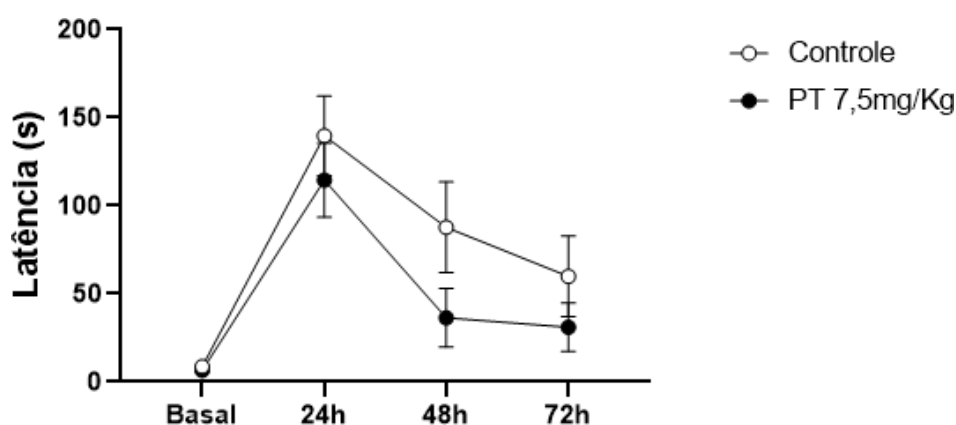


Figura 51: Linha temporal de aquisição e retenção da memória referente a latência para o animal descer da plataforma no teste de Esquiiva-Passiva, em prole de camundongos machos cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 180 segundos. Controle N= 10, PT 7,5mg/kg: N=10

5.13 Sociabilidade e preferência social (prole M)

No teste de sociabilidade, foi verificado que a prole cujos pais foram tratados cronicamente com PT teve uma tendência de redução do tempo de interação com o

estímulo social (**Tabela 9**). Tal observação pode ser devidamente confirmada ao analisarmos o índice de sociabilidade. Neste parâmetro verificamos que a prole do grupo tratado teve uma redução do índice de sociabilidade em relação ao grupo controle ($t(15) = 2,483; 0,78 \pm 0,04$ vs. $0,59 \pm 0,06; p=0,02$) ($\downarrow 24,4\%$) (**Figura 52**)

Tabela 9. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de Interação Social

	Dias	Média (s.)		Média (s.)
Controle	Não Social (NS)	48,75 ± 8,07	Social (S)	189,6 ± 23,78
PT 7.5 mg/kg	Não Social (NS)	66,89 ± 12,10	Social (S)	105,2 ± 18,01

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 30) = 9,649	P = 0,0041
Preferência Social	F (1, 30) = 29,47	P < 0,0001
Tratamento	F (1, 30) = 4,029	P = 0,0538

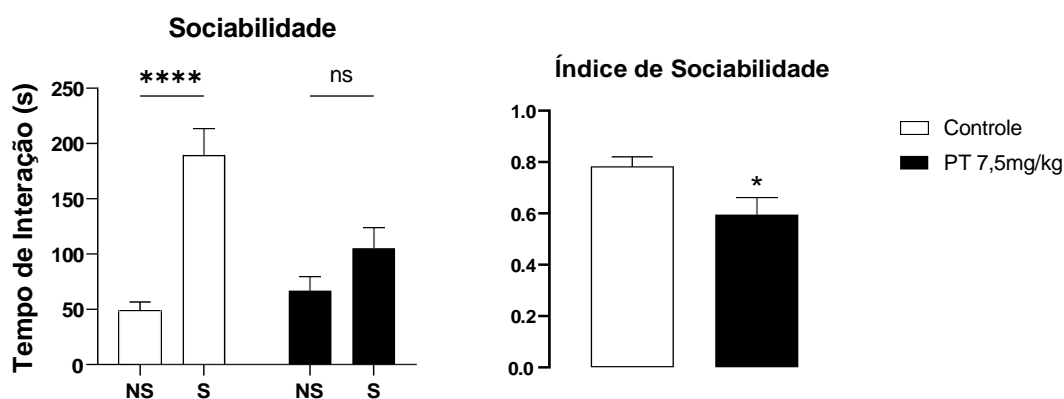


Figura 52: Avaliação do tempo de interação com o estímulo não-social (NS) e o estímulo social (S), na etapa de Sociabilidade do teste de Interação Social, em prole de camundongos machos cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. * representa $p < 0,05$, *** $< 0,0001$. **Controle N = 8, PT 7,5 mg/kg: N=9**

Nessa segunda etapa, não foi visualizada diferença significativa no tempo de interação social entre os animais familiares e desconhecidos (**Tabela 10**). Também houve redução significativa no índice de novidade social entre os grupos ($t(15) = 1,264; 0,63 \pm 0,04$ vs. $0,52 \pm 0,07; p = 0,22$) ($\downarrow 17,5\%$) (**Figura 53**).

Tabela 10. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo social familiar e o estímulo de novidade social na etapa de Preferência Social do teste de Interação Social

	Dias	Média (s.)		Média (s.)
Controle	Familiar (F)	80,13 ± 13,83	Novidade (N)	142,9 ± 24,61
PT 7.5 mg/kg	Familiar (F)	85,00 ± 20,04	Novidade (N)	90,33 ± 17,19

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 30) = 2,209	P = 0,1476
Novidade Social	F (1, 30) = 3,106	P = 0,0882
Tratamento	F (1, 30) = 1,522	P = 0,2268

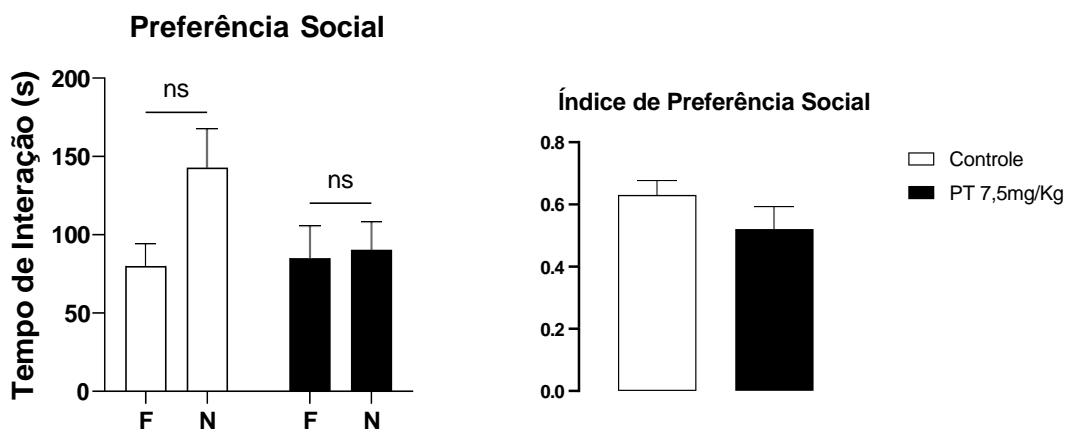


Figura 53: Avaliação do tempo de interação com o estímulo social familiar (F) e o estímulo de novidade social (N), na etapa de Preferência Social do teste de Interação Social, em prole de camundongos cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. **Controle N= 8, PT 7,5 mg/kg: N=9**

5.14 Agressividade (Prole M)

Intruso Residente

No teste Intruso-Residente, podemos verificar que o tratamento paterno com PT não alterou a agressividade da prole quando comparada ao controle (**Figura 54**)

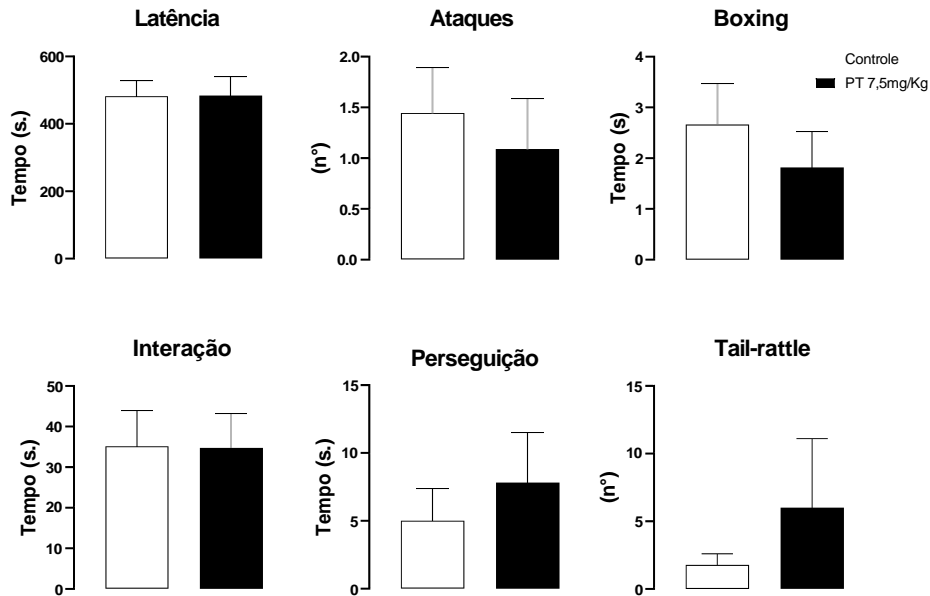


Figura 54: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste Intruso-Residente em prole de camundongos machos cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado com 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. **Controle N= 9, PT 7,5 mg/kg: N=11**

5.15 Memória (Prole F)

5.15.1 Reconhecimento de objetos - 24 h

O mesmo teste foi realizado 24h após a exposição aos objetos. Porém, desta vez, não foi verificada diferença significativa em quaisquer variáveis analisadas.

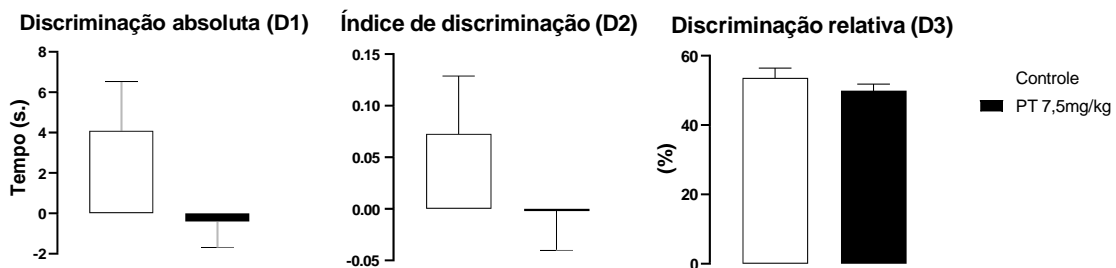


Figura 55: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de Objetos de 24h em prole de camundongos fêmeas cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 11, PT 7,5 mg/kg: N=10**

5.15.2 Labirinto de Barnes

De acordo com os resultados obtidos pelo teste ANOVA two way, foi evidenciada diferença significativa na variável tempo, o que indica que a aquisição da informação espacial foi satisfatória. Por outro lado, conforme a tabela e o gráfico apresentados abaixo, não verificamos diferenças significativas no tratamento e na interação entre as variáveis experimentais (**Tabela 11**)

O 6º dia do teste foi utilizado para verificar o tempo de latência para a entrada

no esconderijo. Porém, não foi verificada diferença significativa entre os grupos. Os resultados sugerem que a memória espacial não foi afetada pela programação paterna com PT (**Figura 56**)

Tabela 11. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao período de treinamento para a aquisição de memória no teste de Barnes Maze.

	Controle	PT 7.5 mg/kg
Dias	Média (s.)	Média (s.)
1	108,3 ± 16,9	111,8 ± 19,3
2	54,0 ± 14,8	79,9 ± 22,6
3	63,0 ± 12,4	29,5 ± 5,5
4	76,0 ± 17,3	70,6 ± 14,2
5	34,6 ± 9,5	56,3 ± 18,5
6	65,3 ± 16,3	46,2 ± 19,7

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (5, 120) = 0,3954	P = 0,8512
Tempo	F (5, 120) = 4,791	P = 0,0005
Tratamento	F (1, 120) = 0,03435	P = 0,8533

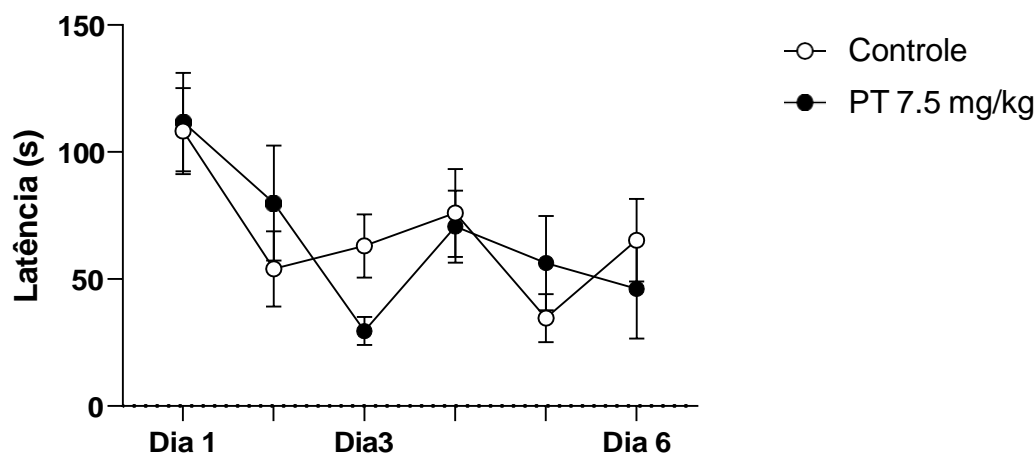


Figura 56: Linha temporal de aprendizado referente a latência para o animal encontrar o esconderijo, em prole de camundongos fêmeas cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 300 segundos. **Controle N= 11, PT 7,5 mg/kg: N=11**

5.15.3 Esquiva passiva

Na esquiva passiva, através dos resultados obtidos pela ANOVA TwoWay foi evidenciada diferença significativa na variável tempo, o que indica que a retenção da informação aversiva foi satisfatória. Por outro lado, conforme a tabela e o gráfico apresentados abaixo, não verificamos diferenças significativas no tratamento e na

interação entre as variáveis experimentais. Devido à falta de resultado significativo na variável interação (**Tabela 12**), os testes post-hoc não foram realizados.

Tabela 12. Resultados da ANOVA Two-Way referentes aos dias de aquisição e retenção de memória do teste Esquiva-Passiva

	Controle	PT 7.5 mg/kg
Dias	Média (s.)	Média (s.)
Basal	9,5 ± 1,9	5,1 ± 0,8
24h	140,0 ± 16,2	112,7 ± 23,7
48h	108,0 ± 16,9	73,4 ± 20,7
72h	77,8 ± 19,8	86,4 ± 24,8

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (3, 80) = 0,6270	P = 0,5996
Tempo	F (3, 80) = 15,68	P < 0,0001
Tratamento	F (1, 80) = 1,309	P = 0,2559

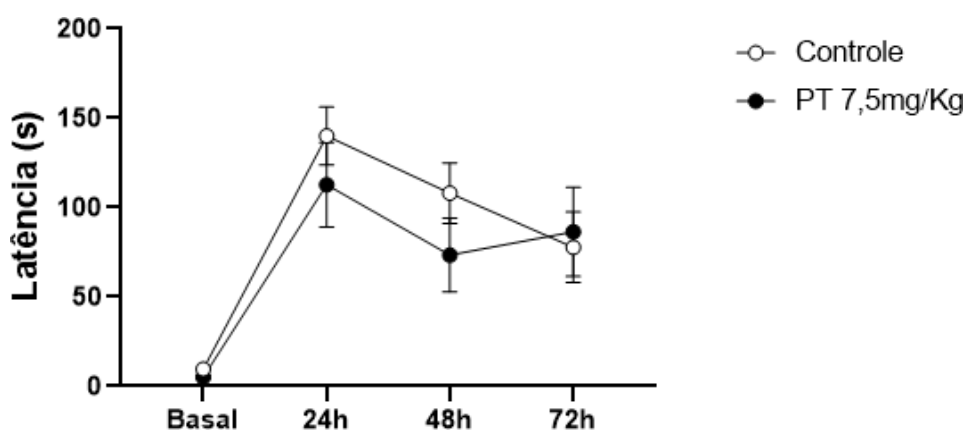


Figura 57: Linha temporal de aquisição e retenção da memória referente a latência para o animal descer da plataforma no teste de Esquiva-Passiva, em prole de camundongos fêmeas cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 180 segundos. Controle N= 11, PT 7,5 mg/kg: N=11

5.16 Sociabilidade e preferência social (prole F)

Na primeira parte do teste, foi verificada diferença significativa no tempo de interação entre os estímulos social e não social apenas no grupo controle (**Tabela 13**). Esse comprometimento da capacidade de interação social no grupo tratado pode ser evidenciado pela redução do índice de preferência social quando comparado ao grupo controle ($t(18) = 2,139$; $78,76\% \pm 3,66$ vs. $59,02\% \pm 8,48$; $p = 0,046$) ($\downarrow 25,1\%$) (**Figura 58**).

Tabela 13. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo não-social e o estímulo social na etapa de Sociabilidade do teste de Interação Social. ** representa $p < 0.01$.

	Dias	Média (s.)		Média (s.)	Post-Hoc Sidak
Controle	Não Social (NS)	30,40 ± 6,44	Social (S)	134,1 ± 35,07	P = 0,0017
PT 7.5 mg/kg	Não Social (NS)	55,80 ± 11,41	Social (S)	76,10 ± 14,65	P = 0,73

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 36) = 4,303	P = 0,0452
Preferência Social	F (1, 36) = 9,513	P = 0,0039
Tratamento	F (1, 36) = 0,6575	P = 0,4228

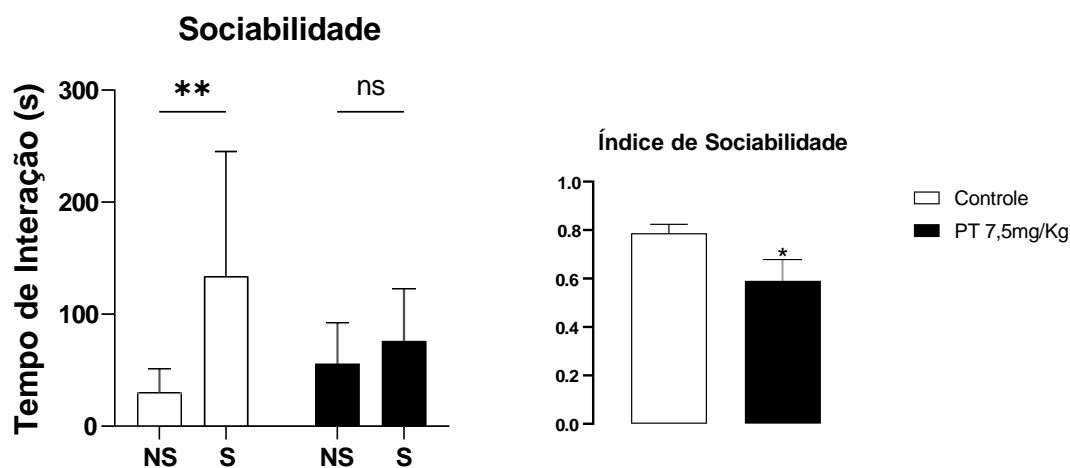


Figura 58: Avaliação do tempo de interação com o estímulo não-social (NS) e o estímulo social (S), na etapa de Sociabilidade do teste de Interação Social, em prole de camundongos fêmeas cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. * representa $p < 0.05$. **Controle N= 10, PT 7,5 mg/kg: N=10**

Na 2^o etapa do teste, foram observadas diferenças significativas no tempo, no tratamento e na interação entre estas variáveis experimentais. É importante salientar que não foi verificada diferença significativa no tempo de interação entre os estímulos familiar e novidade social na prole PT, diferentemente do grupo controle, que passou mais tempo interagindo com o novo animal (**Tabela 14**). Essa diferença também pode ser vista no índice de novidade social, no qual podemos confirmar a menor interação da prole PT com a novidade social ($t(18) = 2,598$; $68,49\% \pm 6,26$ vs. $40,15\% \pm 8,93$; $p = 0,02$) ($\downarrow 41,4$) (**Figura 60**).

Tabela 14. Resultados da ANOVA Two-Way referentes ao tempo de interação com o estímulo social familiar e o estímulo de novidade social na etapa de Preferência Social do teste de Interação Social. ** representa $p < 0.01$.

	Dias	Média (s.)		Média (s.)	Post-Hoc Bonferroni
Controle	Familiar (F)	50,6 ± 5,65	Novidade (N)	174,7 ± 42,73	P = 0,0021
PT 7.5 mg/kg	Familiar (F)	68,6 ± 19,52	Novidade (N)	47,3 ± 13,36	P = 0,79

Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interação	F (1, 36) = 8,745	P = 0,0055
Novidade Social	F (1, 36) = 4,371	P = 0,0437
Tratamento	F (1, 36) = 4,951	P = 0,0324

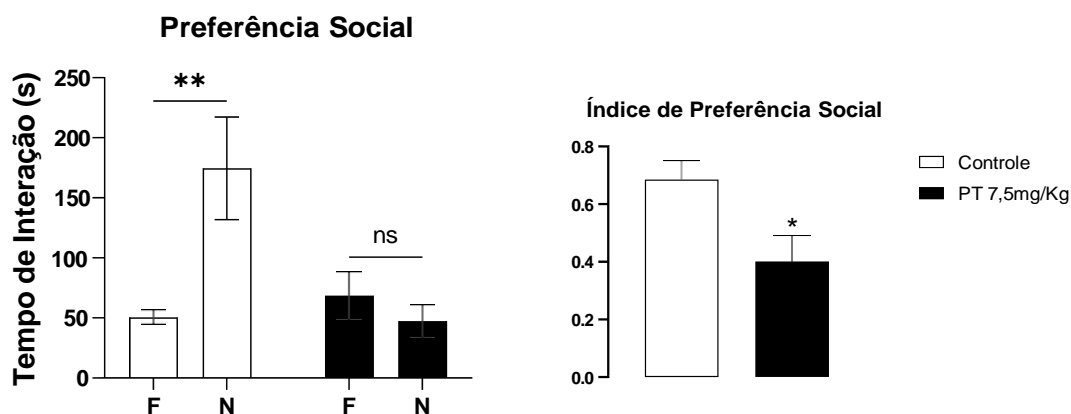


Figura 59: Avaliação do tempo de interação com o estímulo social familiar (F) e o estímulo de novidade social (N), na etapa de Preferência Social do teste de Interação Social, em prole de camundongos fêmeas cujos pais foram tratados com PT ou veículo. Protocolo realizado a partir dos 70 dias de vida pós-natal durante 600 segundos. * representa $p < 0.05$ e ** $p < 0,01$. **Controle N= 10, PT 7,5 mg/kg: N=10**

Abaixo pode ser encontrado o resumo sobre as principais alterações comportamentais e neurobiológicas verificadas nos diferentes protocolos realizados no presente estudo. Para facilitar a compreensão, a sequência descritiva dos resultados, seguem dos pais, que foram submetidos ao tratamento com PT (**Quadro 1**), seguindo para a prole de camundongos machos (**Quadro 2 e Quadro 3**) e fêmeas (**Quadro 4 e Quadro 5**).

- **Pai**

QUADRO 1. Resumo dos resultados dos testes comportamentais nos camundongos machos submetidos ao tratamento com propionato de testosterona. Ns = Não significativo

Teste comportamental	Parâmetro	Resultado
	Atividade Locomotora	Ns
CA	Ansiedade	Ns
	Estresse	Ns
LCE	Ansiedade	Ns
CCE	Ansiedade	Ns
SC	Depressão	Ns
RO 6h	Memória	Diminui
Interação Social	Sociabilidade	Diminui
	Preferência Social	Ns
Intruso Residente	Agressividade	Aumenta

- **Prole M**

QUADRO 2. Resumo dos resultados dos testes comportamentais na prole M 7,5 mg/kg. Ns = Não significativo

Teste comportamental	Parâmetro	Resultado
	Atividade Locomotora	Ns
CA	Ansiedade	Ns
	Estresse	Ns
LCE	Ansiedade	Aumenta
CCE	Ansiedade	Aumenta
SC	Depressão	Diminui
RO 6h	Memória	Ns
RO 24h	Memória	Diminui
Barnes Maze	Memória espacial	Ns
Esquiva-Passiva	Memória aversiva	Ns
Interação Social	Sociabilidade	Diminui
	Preferência Social	Ns
Intruso Residente	Agressividade	Ns

QUADRO 3. Resumo dos resultados referentes à expressão de genes na prole M 7,5 mg/kg. Ns = Não significativo

Gene alvo	Resultado
<i>Tph2</i>	Ns
<i>Hrta1</i>	Ns
<i>Th</i>	Ns
<i>Bdnf</i>	Ns
<i>Ntrk2</i>	Ns
<i>Gad1</i>	Diminuição
<i>Gabra2</i>	Aumento

• **Prole F**

QUADRO 4. Resumo dos resultados dos testes comportamentais na prole F 7,5 mg/kg. Ns = Não significativo

Teste comportamental	Parâmetro	Resultado
	Atividade Locomotora	Ns
CA	Ansiedade	Ns
	Estresse	Aumenta
LCE	Ansiedade	Aumenta
CCE	Ansiedade	Ns
SC	Depressão	Diminui
RO 6h	Memória	Diminui
RO 24h	Memória	Ns
Barnes Maze	Memória espacial	Ns
Esquiva-Passiva	Memória aversiva	Ns
Interação Social	Sociabilidade	Diminui
	Preferência Social	Diminui
Intruso Residente	Agressividade	Ns

QUADRO 5. Resumo dos resultados referentes à expressão de genes na prole F 7,5 mg/kg. Ns = Não significativo

Gene alvo	Resultado
<i>Tph2</i>	Ns
<i>Hrta1</i>	Ns
<i>Th</i>	Ns
<i>Bdnf</i>	Ns
<i>Ntrk2</i>	Ns
<i>Gad1</i>	Ns
<i>Gabra2</i>	Ns

6 DISCUSSÃO

6.1 Massa Corporal e massa testicular (pai)

No que diz respeito aos efeitos fisiológicos decorrentes do uso crônico de PT, não foi verificada diferença na massa corporal dos animais. Desse modo, podemos concluir que o referido tratamento não interfere no ganho de massa dos animais. Este resultado está em consonância com o trabalho de Martinez-Sanchis (1997), que também não visualizou diferença na massa corporal em camundongos machos após o tratamento com PT (MARTINEZ-SANCHIS et al, 1997). Em outro trabalho, em que foi utilizado a administração crônica de decanoato de nandrolona, também não foi verificada alteração na massa corporal (KALININE, 2011). Além disso, nosso trabalho não encontrou diferença significativa nos valores plasmáticos de testosterona entre os grupos. Martinez-Sanchis et al (1997) também não visualizou diferença nos níveis plasmáticos de testosterona após a administração de PT por 10 semanas utilizando uma dose de 7,5 mg/kg. A diferença nos níveis plasmáticos ocorreu somente quando a dose de PT foi de 30 mg/kg (MARTINEZ-SANCHIS et al, 1997). Sabe-se que a elevação dos níveis de testosterona causados pela administração exógena contribui para a modulação por meio de feedback negativo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, reduzindo a liberação endógena de testosterona (DUCA et al., 2019). Essa redução da produção endógena de testosterona, normalmente, está relacionada com uma consequente redução da massa testicular. Esse resultado vai de acordo com outros estudos que demonstram a ação deletéria de doses supra-fisiológicas sobre o sistema reprodutor (MARTINEZ-SANCHIS et al, 1997; KALININE, 2011; OLIVARES et al, 2013; RF SILVA, 2013, ZOTTI et al, 2014) (**Quadro 6**). Provavelmente, a dose administrada, assim como o tempo de tratamento, pode não ter sido o suficiente para verificar níveis plasmáticos mais elevados nos animais tratados. Outra hipótese sugerida seria devido à distância de tempo da última administração de PT até a data de recolhimento do plasma sanguíneo em nossos animais. Os animais do presente trabalho foram submetidos à eutanásia 2 dias após a última administração, enquanto os demais trabalhos costumam realizar o procedimento no mesmo dia ou no dia seguinte após o fim do tratamento. Essa diferença pode ter contribuído para uma diferença não significativa das concentrações plasmáticas de testosterona, porém suficientes para inibir o eixo H-H-G, reduzindo a liberação endógena do hormônio gonadal com consequente redução da massa testicular.

QUADRO 6. Resumo de referências dos efeitos do EAA sobre a massa testicular

Referências	Modelo	Tratamento	Efeito sobre a massa testicular
		3.75, 7.5, 15 e 30	
Martinez-Sanchis et al, 1997;	Camundongo OF1	mg/kg de Propionato de testosterona /10 semanas	Redução (7,5 mg/kg)
Kaliline et al., 2011	Camundongos CF1	15 mg/kg Decanoato de Testosterona por 20 dias (crônico) e 3 dias (subcrônico)	Redução
Olivares et al, 2013;	Ratos Wistar	5 mg/kg de Propionato de testosterona por 5 semanas	Redução
RF Silva, 2013	Ratos Wistar	10 mg/kg de Propionato de Testosterona em 20 administrações	Redução
Zotti et al, 2014	Ratos Wistar	5 mg/kg de Decanoato de nandrolona, 1x por dia, 5x por semana, por 4 semanas	Redução
Lau, RS et al., 2022 (atual)	Camundongos Swiss	7,5 mg/kg de propionato de testosterona, 2x por semana por 5 semanas	Redução

6.2 Parâmetros comportamentais (pai)

No presente estudo, os pais tratados com PT foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para verificar se a administração crônica de uma dose suprafisiológica de androgênios poderia alterar seu comportamento ao final do tratamento. O primeiro teste realizado foi o teste de campo aberto, que é utilizado para verificar a atividade locomotora espontânea e exploratória do animal. Como observado em nosso trabalho, o uso de PT não alterou a atividade locomotora. Esse resultado vai de

acordo com outros estudos que também não verificaram nenhum déficit na atividade locomotora após o uso de EAA (BITRAN et al, 1993; SALVADOR et al, 1999; KALILINE, 2011,).

O presente trabalho buscou também verificar se este modelo essas substâncias seriam capazes de alterar os comportamentos semelhante à ansiedade. Nossos resultados não demonstraram quaisquer alterações referentes a esse tipo de comportamento, seja no teste do LCE ou no CCE. Nosso resultado vai de acordo com o visualizado por Kaliline (2011) que após a administração de decanoato de nandrolona não verificou alteração nos parâmetros de ansiedade no teste do LCE (KALILINE, 2011). A ausência de alteração comportamental também foi observada por Zotti e colaboradores (ZOTTI et al., 2014).

A literatura, porém, possui resultados conflitantes, sendo descritas tanto ações ansiogênicas quanto ansiolíticas após a administração de análogos de testosterona. Segundo Rocha (2006), a administração crônica de decanoato de testosterona (Deca-Durabolin®) em ratos machos Wistar promoveu aumento do comportamento ansiogênico no LCE, caracterizado pela redução da porcentagem de tempo nos braços abertos, sendo esse padrão comportamental revertido após a administração de diazepam (ROCHA, 2006). Não obstante, o fator idade, em concomitância ao uso de EAA, parece também influenciar o aumento de ansiedade. Olivares et. al (2013), ao administrar PT no período crítico da adolescência em ratos Wistar (26 dias), também verificou aumento do comportamento análogo à ansiedade no teste LCE, assim como alterações no balanço autonômico cardíaco e na homeostase hidroeletrolítica na idade adulta (OLIVARES et al, 2013).

Diferentemente dos trabalhos anteriormente citados, Bitran (1993) observou comportamento ansiolítico no LCE em ratos após 1 semana do implante de cápsulas subcutâneas de PT (3,5-5,0 mg/kg). Por outro lado, após 2 semanas de tratamento, este padrão ansiolítico curiosamente não foi mantido. O autor credita esse resultado ao fato de ter verificado um aumento da sensibilidade do receptor GABA_A no córtex cerebral somente durante a primeira semana de tratamento (BITRAN et al, 1993). Já Kouvelas et al (2008) verificaram que doses elevadas de decanoato de nandrolona (15 mg/kg), durante 6 semanas, também foi capaz de aumentar do tempo dispendido nos braços abertos no LCE (KOUVELAS et al., 2008).

Aikei e colaboradores (2002) analisou o efeito da administração de diferentes esteroides e neuroesteróides derivados da testosterona 30 minutos antes do teste de LCE. Ele verificou que todas as substâncias foram efetivas em reduzir os comportamentos

análogos à ansiedade. Neste estudo, podemos destacar que os metabólitos gerados pela ação da 5 α -redutase, como o androsterona e 3 α -androstane-20 α -diol, agonistas GABA_A, contribuem para os efeitos ansiolíticos visualizados. A fim de explicar este efeito ansiolítico dos neuroesteróides, devemos recorrer a um elegante estudo realizado por Yang e colaboradores (2005). Segundo tais autores, a ação dos EAAs poderia estar relacionada a sua ação alostérica nos receptores GABA_A, o que promoveria maior sensibilidade destes receptores ao GABA e uma maior corrente hiperpolarizante. Este efeito foi observado especialmente em receptores GABA_A que possuíam a conformação $\alpha_2\beta_3\gamma_2$.

Além disso, é importante salientar o papel dos receptores androgênicos. Hodosy et al (2012) verificaram efeito ansiolítico na CCE em camundongos submetidos à administração de PT 24h antes dos testes. Tais efeitos eram prontamente revertidos após a administração de flutamida (antagonista de AR), sem que fossem alterados os níveis plasmáticos de testosterona. Tais pesquisadores sugerem que essas alterações poderiam ocorrer devido a ação de neuroesteróides, derivados da biotransformação do EAA, sobre os receptores AR e ER, o que poderia contribuir para eventuais ações não-genômicas dos EAA, especialmente relacionados ao sistema GABAérgico (HODOSY et al, 2012). Esses resultados conflitantes podem estar relacionados à ação de diferentes metabólitos do EAA sobre sítios alostéricos presentes em receptores GABA_A em diferentes regiões encefálicas.

Logo, é possível observar que estudos experimentais de avaliação de comportamentos análogos à ansiedade com o uso de esteroides anabólicos demonstra grande variedade de resultados, estes, muitas vezes, creditados a influência da espécie, da própria substância utilizada, bem como paradigma experimental instituído (PIACENTINO et al. 2015) (**Quadro 7**). Dessa forma, podemos sugerir que não verificamos diferença nos comportamentos análogos à ansiedade em nossos animais, possivelmente, devido ao período de tempo de administração do PT para que fosse possível alterar estes comportamentos. Outra hipótese é que a dose utilizada para esse fármaco em questão não foi o suficiente para gerar essas alterações em nosso modelo experimental. Além do mais, os episódios de ansiedade com o uso de EAA podem acontecer também após a retirada do fármaco (OLIVARES et al. 2014; MORRISON, 2020), o que pode também explicar a ausência de diferença entre os grupos.

QUADRO 7. Resumo de referências dos efeitos do EAA sobre comportamentos análogos à ansiedade

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Ansiedade
Bitran et al, 1993;	Ratos Long-Evans	Propionato de testosterona por 1 semana e 2 semanas	CA / LCE	Ausente / Redução e Ausência
Kaliline, 2011	Camundongos CF1	15 mg/kg Decanoato de Nandrolona por 20 dias e 3 dias	CA / LCE	Ausente
Zotti et al, 2014	Ratos Wistar	5 mg/kg de Decanoato de nandrolona, 1x por dia, 5x por semana, por 4 semanas	LCE	Ausente
Rocha, 2006	Ratos Wistar	5 mg/kg de Decanoato de nandrolona, 2x por semana por 6 semanas	LCE	Aumento
Olivares et al., 2013	Ratos Wistar	5 mg/kg de Propionato de testosterona por 5 semanas	LCE	Aumento
Morrison, 2020	Hamster Sírios	2 mg/ kg Cipionato de Testosterona + 2 mg/kg decanoato de nandrolona + 1 mg/kg diidrotestosterona por 30 dias consecutivos c/ 21 dias de retirada	LCE	Aumento

QUADRO 7 (continuação)

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Ansiedade
Aikei et al., 2002	Camundongo <i>Mus Musculus</i>	25, 100 e 250 µL de Testosterona / 500 µL diidrotestosterona e 5 µL estradiol / 25, 100 e 250 3 500 µL de Androsterona / 25, 100, 250, 500 µL de 3α-androstanediol (3α—diol)	LCE	Redução
Hodosy et al., 2012	Ratos Wistar	5 mg/kg de Propionato de testosterona 24h antes dos testes	LCE / CCE	Ausente / Redução
Lau, RS et al., 2022 (atual)	Camundongos Swiss	7,5 mg/kg de propionato de testosterona, 2x por semana por 5 semanas	CA/LCE/CCE	Ausência

Posteriormente, foi realizado o teste de suspensão pela cauda que é um modelo, normalmente, utilizado para a triagem de fármacos antidepressivos. Esse teste está relacionado, principalmente, ao comportamento semelhante ao desespero, caracterizado pelo tempo de imobilidade do animal. Em nosso trabalho, não observamos diferença significativa na latência, nem no tempo de imobilidade, o que sugere a programação paterna com PT não alterou os comportamentos semelhantes à depressão na prole adulta.

Na literatura, podemos observar que o uso de testosterona é, normalmente, prescrito para melhorar o humor em pacientes com depressão que possuem baixos níveis plasmáticos de testosterona como homens senescentes (ALMEIDA, 2008). Em concordância com o estudo anterior, em um modelo de linhagem de camundongos com envelhecimento precoce, foi constatada uma correlação negativa entre níveis plasmáticos

de testosterona e o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (EGASHIRA et al, 2010)). Foi visto também que o uso de testosterona ou algum de seus metabólitos (DHT, 3 α -diol e estradiol) foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade no teste de natação forçada, seja em camundongos machos ou fêmeas desta mesma linhagem com envelhecimento precoce. A ação pode ser devido a interação desses metabólitos com os sítios alostéricos no receptor GABA_A, tal como o 3 α -diol, que também possui afinidade pelo receptor ER β , contribuindo para seus efeitos ansiolíticos e antidepressivos (FRYE e WALF, 2009).

Estudos que associam o uso de doses elevadas de testosterona e o aumento do comportamento semelhante à depressão também já foram descritos. Foi observado que o uso de doses elevadas de decanoato de nandrolona ou enantato de testosterona (20 mg/kg), durante seis semanas, aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Porém, o mesmo foi revertido pela realização de um protocolo de exercício físico. Este trabalho demonstrou que o regime de tratamento com os EAA aumentou o número de células imunorreativas para o receptor androgênico (AR), não afetando a expressão do ER α em regiões do hipocampo (CA1, CA2/3, giro denteado). Ainda segundo este estudo, também foi verificado uma redução no número de interneurônios gabaérgicos imunorreativos para parvobulmina, principalmente, na região do giro denteado. Esses resultados parecem contribuir para o efeito pró-depressivo visualizado no teste comportamental (SELAKOVIC et al, 2019). Outro estudo verificou que o uso de decanoato de nandrolona ou estanozolol (5 mg/kg), por 4 semanas, levou a um aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Foi verificado uma redução dos níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal, assim como do receptor glicocorticoide de baixa afinidade. Além disso, foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, o que também contribui para um fenótipo semelhante à depressão. Por fim, o uso de um antidepressivo (clorimipramina) reverteu os efeitos visualizados pelo uso de EAA (MATRISCIANO et al., 2010). Abaixo encontram-se as referências apresentadas demonstrando os diferentes tratamentos e como essas singularidades podem explicar as diferenças encontradas nos mais diferentes trabalhos (**Quadro 8**).

QUADRO 8. Resumo de referências dos efeitos do EAA sobre comportamentos análogos à depressão

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Depressão
Almeida, 2008	Ser humano	-	-	Redução
	Camundongo de senescência	-	CA / Rotarod / LCE /	Aumento (camundongos c/ senescência
Egashira et al, 2009	acelerado e camundongos resistentes a senescência		Esconder-esferas / SC /	acelerada) /
	Camundongos C57/BL6	1 mg/kg	Nado forçado	Redução
Frye e Walf, 2009	envelhecidos (\pm 24 meses)	Testosterona, DHT, 3 α -diol e estradiol 1h antes do teste		
Selakovic et al., 2019	Ratos Wistar	20 mg/kg Decanoato de nandrolona ou enantato de testosterona, 1x por semana por 6 semanas	Suspensão pela cauda	Aumento
Matrisciano et al, 2010	Ratos Wistar	5 mg/kg de decanoato de nandrolona ou stanozolol, por 28 dias consecutivos 7,5 mg/kg de propionato de	Nado Forçado	Aumento
Lau, RS et al, 2022 (atual)	Camundongos Swiss	testosterona, 2x por semana por 5 semanas	SC	Ausência

Posteriormente, buscamos verificar se o tratamento crônico com EAA poderia impactar a capacidade de memória mnemônica de camundongos adultos. Para este propósito, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos (RO). Estudos prévios

demonstraram que esse teste é dependente de circuitos neurais provenientes de áreas hipocâmpais e do córtex perirrinal (ANTUNES&BIALA, 2012). Em nosso modelo experimental, foi visualizado que o tratamento com PT prejudicou a capacidade mnemônica dos animais tratados, visto que os mesmos passaram mais tempo explorando o objeto familiar em comparação ao novo objeto. Em condições normais, espera-se que os animais passem mais tempo explorando o novo objeto (ENNACEUR, 2010).

Em um trabalho realizado por Silva et al (2013), que buscou avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de PT sobre a memória de ratos Wistar, foi verificado que o tratamento agudo não alterava o tempo de exploração do objeto novo. Por outro lado, foi verificado que o tratamento crônico reduziu o tempo de exploração do objeto novo quando comparado ao controle (visualizado através do índice de exploração). Também não foi observada diferença significativa entre o tempo de exploração do objeto novo e familiar (RF SILVA et al, 2013). Outro estudo verificou que o tratamento crônico com decanoato de nandrolona prejudicou a memória de reconhecimento social no teste de memória olfativa. Embora o tratamento não tenha afetado a aquisição, os animais tratados passaram mais tempo com o estímulo social, já apresentado anteriormente, quando comparado aos demais grupos. Este teste se mostrou dependente da ação dos receptores androgênicos, visto que o bloqueio desses receptores por flutamida revertia os efeitos anteriormente descritos (KOUVELAS et al, 2008).

O hipocampo está diretamente envolvido nos processos de memória e aprendizagem. Além disso, é uma região significativa densidade de receptores androgênicos, podendo ser influenciada por hormônios esteroides (NAGHDI et al, 2001). Dessa forma, a administração localizada de análogos de testosterona também pode prejudicar a memória. Foi observado que injeção intra-hipocâmpal de altas doses de testosterona na área CA1 do hipocampo foi capaz de prejudicar a memória espacial no teste Morris Water Maze (MWM) no 3º dia, assim como a administração local de flutamida, que piorou a aquisição de memória nos 2º e 3º dias (NAGHDI et al, 2001). Em outro estudo do mesmo realizado pelo mesmo grupo, foi demonstrado que altas doses de enantato de testosterona em ratos adultos, assim como a injeção local de anisomicina, quando administrados isoladamente, prejudicaram o processo cognitivo no MWM. Porém, os efeitos negativos foram revertidos pela administração conjunta de ambos os fármacos (NAGHDI et al, 2005). Como a anisomicina é um inibidor da síntese proteica, é possível que esta droga seja capaz de inibir mecanismos traducionais induzidos por ações genômicas da testosterona.

Uma outra explicação para os efeitos deletérios dos EAA sobre a memória está relacionada à ação destes fármacos sobre algumas neurotrofinas e seus receptores. Segundo Pieretti et al. (2015), a administração crônica de doses supra-fisiológicas de decanoato de nandrolona ou estanozolol promoveu um prejuízo da memória em ratos no teste MWM. Foi demonstrado que este tratamento promoveu aumento dos níveis do fator de crescimento do nervo (*Nerve Growth Factor* – NGF) e redução do conteúdo proteico do receptor p75NTR no hipocampo. Entretanto, este mesmo tratamento causou uma redução dos níveis de NGF, sem qualquer alteração no conteúdo de p75NTR, no prosencéfalo basal. Os autores sugerem que a nandrolona e o stanozolol prejudicam o transporte retrógrado de NGF do hipocampo, reduzindo a sobrevivência dos neurônios colinérgicos localizados no prosencéfalo, constatado pelo menor conteúdo proteico de colina acetiltransferase (*choline acetiltransferase* - ChAT) nesta região. Vale ressaltar que o transporte retrógrado de NGF dos terminais hipocâmpais em direção ao prosencéfalo é dependente da interação do receptor p75NTR ao TrkA, o que aumenta a afinidade desta proteína ao próprio NGF. Como os EAA reduzem o conteúdo proteico de p75NTR, é provável que a interação entre esses dois receptores seja comprometida, assim como o transporte retrógrado do NGF para o prosencéfalo (PIERETTI et al, 2013).

Outra hipótese que pode ser utilizada para explicar os prejuízos cognitivos induzidos pelo tratamento crônico com PT é os níveis de BDNF, uma outra neurotrofina envolvida nos processos de aprendizagem e memória. Matrisciano et al, 2010 demonstrou que a exposição à nandrolona reduziu os níveis de BDNF no hipocampo e córtex frontal. Além disso, foram encontrados baixos níveis plasmáticos de BDNF em homens halterofilistas, usuários de EAA, assim como em ex-usuários, quando comparado aqueles homens que não utilizam nenhuma substância. Esse resultado demonstra uma eventual interferência do tratamento com EAA sobre a neuroplasticidade e suas possíveis consequências cognitivas ao indivíduo (BJØRNEBEKK et. al, 2022). Inúmeros trabalhos publicados na literatura descrevem o papel do BDNF sobre a memória. Em um desses estudos, foi realizada manipulação genética por recombinação CreLox, a fim de induzir o silenciamento do gene que expressa o BDNF. Como resultado desta técnica, os animais apresentaram redução no tempo de interação com o novo objeto no teste de reconhecimento de objetos, bem como prejuízo na memória espacial no teste MWM (HELDT et. al, 2007).

Trabalhos realizados em humanos que avaliaram os efeitos do uso abusivo de EAA na performance mnemônica também são escassos. Porém, um trabalho realizado

por Kanayama e colaboradores (2012) avaliou o impacto da utilização de anabolizantes em homens treinados em musculação na cidade de Middlesbrough, na Inglaterra. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, foi demonstrado que o grupo de usuários de EAA não apresentou diferença significativa nos testes de avaliação de tempo de reação, atenção sustentada e memória verbal. Porém, no que diz respeito à memória visuoespacial, foi verificado que os usuários de EAA tinham uma piora desta variável quando comparado ao grupo de homens não-usuários. Vale ressaltar que foi constatada uma correlação negativa entre o tempo de uso de EAA e a performance mnemônica visuoespacial (KANAYAMA et al, 2012).

No que concerne aos eventuais efeitos benéficos sobre a memória induzidos pela administração de testosterona, podemos citar o estudo por Luine (2015). De acordo com este trabalho, foi demonstrado que animais submetidos à orquiectomia apresentavam redução da performance mnemônica no teste de reconhecimento de objetos. Porém, este déficit cognitivo é revertido após a administração de PT (LUINE, 2015). Tais efeitos positivos poderiam ser mediados pelos metabólitos de testosterona (3 α -diol, 3 β -diol) e androsterona, especialmente, via receptores ER β (FRYE et al, 2008).

Já no trabalho realizado por Rivas-Aranciba e Vasquez-Pereira (1994), foi demonstrado que tanto o tratamento com enantato de testosterona quanto com estradiol são capazes de induzir a extinção da memória após um protocolo de esquivas passiva por 10 minutos. Os autores sugerem que essa alteração pode ser devido a possível modulação dos hormônios esteroides sobre o sistema colinérgico, importante nos processos de aprendizagem e memória. Porém, no mesmo estudo, foi visto que o decanoato de nandrolona prejudicou a extinção da memória após 10 semanas (RIVAS-ARANCIBA e VASQUEZ-PEREIRA, 1994).

Levando em consideração as evidências científicas supracitadas, podemos considerar que há uma faixa considerada ótima dos níveis de androgênios circulantes para que não haja comprometimento dos mecanismos de neuroplasticidade envolvidos com a consolidação de novas memórias. Possivelmente, estes mecanismos podem envolver um conjunto de fatores transcricionais modulados negativa ou positivamente pela testosterona (**Quadro 9**)

QUADRO 9. Resumo de referências dos efeitos do EAA sobre a memória

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Memória
RF Silva et al., 2013	Ratos Wistar	10 mg/kg de Propionato de Testosterona em 20 administrações	Reconhecimento de Objetos	Redução
Kouvelas et al., 2008	Ratos Wistar	15 mg/kg de Decanoato de nandrolona, diariamente por 6 semanas	Reconhecimento Social	Redução
Rivas-Aranciba e Vasquez-Pereira et al.,		20 mg/kg de Enantato de Testosterona, 4 mg/kg de Decanoato de nandrolona ou 0,8 mg/kg de estradiol (realizado 24h antes da aquisição e após a retenção) por 10 semanas	Esquiva-Passiva	Redução
Pieretti et al., 2013	Ratos Wistar	5 mg/kg de decanoato de nandrolona ou stanozolol	Morris Water Maze	Redução
Naghdi et al. 2001	Ratos Wistar	injeção intrahipocampal em CA1 de 0, 20, 40, 80 µg de Enantato de testosterona com ou sem flutamida	Morris Water Maze	Redução / Aumento

QUADRO 9 (continuação)

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Memória
Kanayama et al., 2012	Ser humano		Memória espacial	Redução
Luine, 2015	Gonadectomizados	Propionato de Testosterona	Tarefa de objeto de reconhecimento	Aumento
Frye et al., 2008	Camundongos machos C57BL/6 <i>Wild-Type</i> ou ratos Long-Evans β ERKO ou gonadectomizados (GDX)	1 mg/kg de 3 α - diol, 3 β -diol ou androsterona	Reconhecimento de objetos	Aumento em GDX e ausência (β ERKO)
Lau, RS et al., 2022 (atual)	Camundongos Swiss	7,5 mg/kg de propionato de testosterona, 2x por semana por 5 semanas	Reconhecimento de objetos	Redução

Os animais também foram submetidos ao teste de interação social a fim de avaliar se o tratamento com PT teria a capacidade influenciar o comportamento social. Esse teste, normalmente, é utilizado para avaliação de comportamentos semelhante ao autismo (REIN et al., 2020). Na primeira etapa deste teste, verificamos que os animais tratados cronicamente com PT tiveram menor índice de preferência social quando comparados ao grupo controle, sem alteração na preferência social. Trabalhos anteriores têm demonstrado que essa primeira etapa é mais sensível para detectar déficits sociais em modelos animais para autismo (REIN et al, 2020). Em geral, este resultado pode sugerir que o grupo tratado possui um engajamento/interesse social relativamente reduzido (REIN et al., 2020).

A avaliação dos efeitos dos EAA sobre o comportamento social já é bem estabelecida na literatura. Paradigmas como intruso-residente (OLIVARES et al., 2014; KALILINE, 2011; LUMIA et al, 1994) e dominância no tubo são os testes mais utilizados para este fim. Porém, quando se trata do paradigma de 3 câmaras para avaliação social, não foram encontrados trabalhos que avaliassem o comportamento social após a

administração de EAA. Ao se verificar trabalhos que avaliam o autismo e possíveis genes envolvidos em sua fisiopatologia, alguns alvos foram encontrados. Dessa forma, genes como *Nlgn1*, *Nlgn4*, *Nlgn3*, *Neurexin 1a*, *Pten*, *Slc6a4*, *Gabrb3*, entre outros, surgem como possíveis alvos, estando envolvidos com comportamentos típicos visualizados nessa patologia, como sociabilidade reduzida, falta de preferência social, comportamento estereotipado, déficits motores, cognitivo, hiperatividade e distúrbios do sono (SILVERMAN et al., 2010). Por sua vez, quando se trata das áreas implicadas na fisiopatologia da doença pouco ainda se sabe, porém, áreas como o hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala, cerebelo e circuito cerebelo-tálamo-cortical têm sido relacionada à doença do Espectro Autista (DELOREY et al., 2008).

Como citado anteriormente, o gene *Gabrb3*, localizado dentro da região 15q11-13, codifica a subunidade $\beta 3$ do receptor GABA_A, além de mais outras duas subunidades $\alpha 5$ e $\gamma 3$, e tem sido relacionado à fisiopatologia do autismo (DELOREY et al., 2008). Em um trabalho realizado por Delorey et al. (2008) foi verificado que camundongos knockout para o gene *Gabrb3* dispenderam menos tempo interagindo com o estímulo social na 1^o etapa, porém com uma leve preferência social pelo animal não-familiar na 2^o etapa do teste. O autor relata ainda que os animais knockout para este gene possuíam uma redução de volume do vermis cerebelar, que já foi visto estar relacionado com baixo desempenho exploratório, memória contextual prejudicada, coordenação motora deficiente, entre outros (DELOREY et al., 2008).

O abuso de análogos de testosterona também tem sido relacionado a comportamentos de impulsividade. Agrawal e Dwivedi (2020) verificou que a administração de PT em ratos não gonadectomizados modulou o sistema GABAérgico, por reduzir a expressão do mRNA dos genes *Gabra3*, *Gabra5* e *Gabra6* do receptor GABA_A no córtex pré-frontal, sem alteração nas demais subunidades avaliadas. Além disso, houve uma redução nos níveis *Camk4*, responsável por codificar a proteína quinase IV dependente de cálcio/calmodulina (CAMK4), que tem como função já estabelecida a regulação da transcrição de linfócitos, neurônios e células germinativas masculinas. Apesar de não está bem estabelecido a relação entre CAMK4 e neurônios GABAérgicos, o autor sugere que essa regulação negativa pode ter influenciado a expressão de genes do receptor GABA_A, podendo ser uma das hipóteses para a alteração comportamental observada (AGRAWAL e DWIVEDI, 2020). Logo, podemos sugerir que as possíveis modulações sobre o sistema GABAérgico implicadas pela administração de doses suprafisiológica de análogos de testosterona podem levar à déficits de sociabilidade.

Por fim, também verificamos que o tratamento crônico com PT também é capaz de aumentar as respostas inerentes ao comportamento de agressividade. Olivares e colaboradores (2014) verificaram que, após o tratamento com PT, os animais também tiveram aumento do comportamento agressivo (OLIVARES et al, 2014). Este aumento da agressividade pode ser visto também em diversos outros estudos, mais uma vez fortalecendo a hipótese de que o PT pode induzir este comportamento (BITRAN et. Al, 1993; KALILINE, 2011). Lumia e colaboradores (1994) verificaram que administração crônica de PT (1mg/kg) aumentava o número de ataques, de ameaças e a frequência de postura de dominância em ratos intactos. Nestes animais, não foi demonstrada qualquer diferença de massa corporal. Portanto, o aumento da agressividade foi de fato induzida pela alteração dos níveis séricos de testosterona e não por uma vantagem física (LUMIA et al, 1994).

A agressividade tem sido relacionada com alguns neurotransmissores, tais como a vasopressina (AVP), serotonina (5-HT) e GABA. Enquanto, o sistema vasopressinérgico e gabaérgico estão envolvidos na expressão do comportamento agressivo, podemos verificar que o sistema serotoninérgico está envolvido na modulação e redução da agressividade em áreas como o hipotálamo anterior (HÁ), septo lateral, amígdala medial e hipotálamo ventromedial (GRIMES et al., 2007).

Partindo dessa premissa, foi visto que o tratamento com um pool de EAA durante 28 dias foi capaz de promover aumento da agressividade em hamsters sírios machos no teste intruso-residente. Segundo os autores esse aumento da agressividade foi resultado por um desbalanço entre fibras AVP/5HT. Esse protocolo levou ao aumento de fibras marcadas com AVP após 14 dias de tratamento, além de redução de fibras 5-HT na região do HA após apenas 7 dias de tratamento. (GRIMES et al., 2007). Além disso, redução na expressão de mRNA de alguns receptores serotoninérgicos (5HT1_A, 5HT1_B, 5HT2_A, 5HT2_C) em regiões da amígdala, hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal em camundongos foram visualizados, após um protocolo com decanoato de nandrolona, o que também poderia contribuir para um fenótipo agressivo (AMBAR E CHIAVEGATTO, 2009). Por outro lado, a administração de um agonista para receptor serotoninérgico (Quipazina) reverteu o comportamento agressivo em ratos tratados com PT ou espontaneamente dominantes, demonstrando que esse sistema de fato está envolvido com o fenótipo de agressividade (BONSON e WINTER, 1992).

O sistema GABAérgico parece também facilitar comportamentos agressivos. Em trabalho em que ratos foram tratados com EAA durante o período da adolescência,

também foi verificado aumento da agressividade. Este comportamento foi associado a um aumento da enzima GAD₆₅ em regiões como amígdala medial (AMe), hipotálamo anterior (HÁ) e hipotálamo ventromedial (HVm). A agressividade ainda foi aumentada após a administração de muscimol (agonista GABA_A) no HA em hamster, porém não foi reduzida após a administração de bicuculina (antagonista GABA_A) (SCHWARTZER, RICCI, MELLONI JR., 2009). Esse aumento da agressividade pode estar relacionado à possível modulação que o sistema gabaérgico realiza sobre o sistema serotoninérgico em regiões como HA, AMe e HVm, causando desinibição de um estado agressivo, que é controlado pela 5-HT (GRIMES, RICCI e MELLONI JR, 2003).

Dessa forma, com base em nossos resultados, podemos constatar que o tratamento crônico com EAA é capaz de induzir o fenótipo agressivo em camundongos adultos. Possivelmente, este comportamento se deve a alterações no sistema GABAérgico e/ou serotoninérgico. Mais estudos serão necessários a fim de identificar os mecanismos envolvidos com exacerbação desta resposta comportamental (**Quadro 10**)

QUADRO 10. Resumo de referências dos efeitos do EAA sobre comportamentos de agressividade

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Agressividade
Olivares et al., 2014	Ratos Wistar	5 mg/kg de Propionato de testosterona por 5 semanas	Intruso Residente	Aumento
Britan et al., 1993	Rato Long-Evans	Propionato de testosterona por 1 semana e 2 semanas	Intruso Residente	Aumento
Kaliline et al., 2011	Camundongos CF1	15 mg/kg Decanoato de Testosterona (crônico e subcrônico)	Intruso Residente	Aumento
Lumia et al., 1994	Ratos Long-Evans	1 mg/kg de Propionato de Testosterona	Intruso Residente	Aumento

QUADRO 10 (continuação)

Referências	Modelo	Tratamento	Testes	Agressividade
Grimes et al., 2007	Hamsters sírios machos	2 mg/kg de cipionato de testosterona + 2 mg/kg de nortestosterona + 1 mg/kg de undecilato de dihidroxitestosterona por 3, 7, 14 e 28 dias	Intruso Residente	Aumento
Ambar e Chiavegatto, 2009	Camundongos C57BL/6J	15 mg/kg de decanoato de nandrolona, 1x por dia, durante 28 dias consecutivos	Intruso Residente	Aumento
Bonson e Winter, 1992	Ratos Machos	30 mg/kg de propionato de testosterona, 1x por dia, durante 14 dias	Competição por pellet de açúcar	Aumento
Grimes, Ricci e Melloni Jr, 2003	Hamsters machos	2 mg/kg de cipionato de testosterona + 2 mg/kg de nortestosterona + 1 mg/kg de undecilato de dihidroxitestosterona	Intruso Residente	Aumento
Schwartzter, Ricci, Melloni Jr., 2009	Hamster machos	2 mg/kg de cipionato de testosterona + 2 mg/kg de nortestosterona + 1 mg/kg de undecilato de boldenona 7,5 mg/kg de propionato de	Intruso Residente	Aumento
Lau, RS et al., 2022 (atual)	Camundongos Swiss	testosterona, 2x por semana por 5 semanas	Intruso Residente	Aumento

6.3 Parâmetros comportamentais e neurobiológicos (prole M e F)

Após a prole ter completado 70 dias de vida, tanto os machos quanto as fêmeas, foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, a fim de verificar as possíveis alterações comportamentais que podem ter sido influenciados pelo tratamento. Por sua vez, foram empregados também métodos em biologia molecular, com o objetivo de

verificar as possíveis alterações neurobiológicas em estruturas encefálicas envolvidas no controle da emocionalidade, afetividade e cognição.

Inicialmente, foram realizados uma bateria de testes para avaliação dos comportamentos análogos à ansiedade e depressão (CA, CCE, LCE e SC). Como pode ser observado nos resultados, foi demonstrado um aumento dos comportamentos análogos à ansiedade na prole de ambos os sexos. Outro fenótipo que se buscou verificar na prole foi o comportamento semelhante à depressão através do teste de suspensão pela cauda. Em nosso trabalho, foi observado um perfil antidepressivo. Esse perfil antidepressivo foi visto tanto na prole M quanto na prole F.

Apesar da literatura ser mais extensa aos efeitos da exposição materna ao ambiente e suas consequências na prole, estudos que envolvem a influência paterna estão aumentando com o decorrer dos anos. Em um trabalho realizado por Dietz et al. (2011), camundongos machos foram submetidos ao protocolo de derrota social durante 10 dias e, posteriormente, colocados para acasalamento. Foi verificado na prole gerada, tanto os machos quanto as fêmeas, a apresentação de um fenótipo comportamental semelhante à ansiedade e depressão na idade adulta. Corroborando com o trabalho anterior, Niknazar et al. (2013) submeteram ratos *Wistar* machos a um modelo de estresse aquático. Segundo estes autores, a prole desses animais despendeu menos tempo nos braços abertos no teste do LCE, assumindo também um perfil comportamental ansiogênico, assim como níveis séricos de corticosterona mais elevado comparado à prole controle. Foi visto também que em um protocolo de estresse crônico por instabilidade social realizado em camundongos machos resultou em prole fêmeas com perfil mais ansiogênico, caracterizado pelo menor tempo de permanência nos braços aberto do LCE, enquanto a prole de machos não apresentou o mesmo padrão comportamental. O autor, ao repetir os testes na geração seguinte (F2), verificou que o comportamento ansiogênico na prole de fêmeas se mantivera, demonstrando um efeito transgeracional (SAAVEDRA-RODRÍGUEZ et al. 2013). Além disso, é importante ressaltar que a nossa programação paterna com PT contribuiu para a geração de um fenótipo agressivo, normalmente, relacionado não apenas com níveis elevados de testosterona, mas níveis de corticosterona aumentados (MARTINEZ-SANCHIS et al., 1997). Apesar de não termos verificado em nosso estudo os níveis séricos de corticosterona, podemos sugerir também que os altos níveis de estresse apresentado pelos pais tratados podem ter corroborado para possíveis modificações epigenéticas ocorridas na linha germinativa paterna e modulado o aparecimento de comportamentos análogos à ansiedade na prole na idade adulta.

Os transtornos de ansiedade são uma das principais doenças mentais da atualidade e possuem com a depressão um alto grau de comorbidade. Sabe-se, atualmente, que essas doenças possuem características hereditárias, sendo, portanto, capazes de serem transmitidas para os filhos (BARTLETT et al, 2017). Em nosso trabalho, apesar dos pais submetidos ao tratamento com PT não terem apresentado um perfil ansiogênico, a prole apresentou. Isso pode sugerir que, possivelmente, mecanismos epigenéticos tenham afetado a linha germinativa paterna, implicando em alterações em sua descendência.

O sistema GABAérgico tem sido alvo de diversas pesquisas sobre o tema, visto que sua disfunção tem sido relacionada às desordens de ansiedade e depressão (KALUEFF-NUTT 2007). Dessa forma, buscamos avaliar alguns genes, normalmente, envolvidos nessas patologias na região do hipocampo. Genes envolvidos com o sistema gabaérgico como o *Gabra2* (subunidade α_2 do receptor GABA_A) e *Gad1* (enzima GAD₆₇) tiveram sua expressão alterada na prole de camundongos machos, mas não em fêmeas. Nos machos tivemos uma diminuição da expressão do gene *Gad1* e um aumento na expressão do gene *Gabra2*.

A enzima glutamato descarboxilase (GAD) é responsável pela conversão de glutamato em GABA (ASADA et al. 1997; HILL et al. 2008). Existem dois tipos de GAD que podem ser expressas através do seu peso molecular, a saber: GAD₆₅ e a GAD₆₇, que juntas correspondem por cerca de 99% da produção de GABA no cérebro (SANDHU, 2015). Essas enzimas podem estar presentes em regiões não prioritariamente GABAérgicas, sugerindo participação na plasticidade neuronal. (ASADA et al. 1997). Foi visto que a redução da síntese de GABA na amígdala, causados por distúrbios genéticos que envolvam as enzimas GAD, induzem aumento de ansiedade, diminuindo a eficácia do tratamento com benzodiazepínicos (SANDHU, 2015). Já em um elegante estudo realizado por Miyata et al (2021), em que foi usado camundongos *knockout* para o gene *Gad1*, foi verificado que baixos níveis de GAD₆₇ é capaz de promover alterações comportamentais, caracterizado pelo menor tempo na área central do CA, assim como uma resposta prejudica no teste de sobressalto acústico. Além disso, baixos níveis de GAD₆₇ têm sido uma observação consistente em cérebros *post mortem* de pacientes com vários transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, transtorno bipolar e transtorno depressivo maior (MIYATA et al. 2021).

Outros estudos, por sua vez, referentes à programação materna e mecanismos epigenéticos sobre a expressão de *Gad1* e suas consequências na prole, podem ser visualizados na literatura. Foi visto que a hipermetilação desse gene na região da amígdala

basolateral, relacionado ao aumento da expressão da enzima DNMT1, em camundongos (ZHU et al., 2018) e ratos (ZHOU et al., 2013), levou a um exofenótipo ansiogênico da prole na idade adulta.

O sistema gabaérgico possui dois receptores: receptor GABA_A (ionotrópico) e o receptor GABA_B (metabotrópico). O receptor ionotrópico GABA_A é formado por várias subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} formando alguns clusters, sendo os mais frequentes $2\alpha_2\beta_1\gamma$, que representa 40% de todo o receptor GABA_A no encéfalo, e o $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, mais comum na região límbica, córtex cerebral e corpo estriado, representando 20% de todo receptor GABA_A no encéfalo. Esse receptor possui sítios alostéricos que permitem a ligação de benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e álcool sendo, portanto, modulados por essas substâncias (KALUEFF-NUTT, 2007). Cepa de camundongos mutantes para a subunidade α_2 (α_2H101R) são resistentes aos benzodiazepínicos e, portanto, não apresentaram os efeitos ansiolíticos do diazepam no teste do LCE e CCE. Porém, os efeitos sedativos e anticonvulsivantes foram completamente mantidos (LÖW et al., 2000). Em outro trabalho em que foi usado camundongos knockout para o gene *Gabra2*, se observou que tanto o diazepam quanto o pentobarbital falharam em induzir um efeito ansiolítico em um teste condicionado de resposta emocional. Dessa forma, a subunidade α_2 parece ter um papel fundamental nas respostas ansiolíticas exercidas pelos benzodiazepínicos (DIXON, ROSAHL e STEPHENS, 2008).

Por sua vez, elevação na expressão da subunidade α_2 e aumento dos comportamentos análogos à ansiedade são relatados na literatura. Foi observado em prole adulta cujas mães foram submetidas à dieta hiperlipídica, aumento nos níveis de BDNF na região dorsal do hipocampo, assim como da subunidade α_2 e do receptor 5HT_{1A} na região ventral do hipocampo. (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Estes resultados estão de acordo com o observado em nosso trabalho, que verificou que a administração de doses suprafisiológicas de PT levou a elevação da expressão do gene que dá origem a subunidade α_2 do receptor GABA_A, o que levou a comportamentos análogos à ansiedade observado na prole. Podemos sugerir que os insultos neuroendócrinos em momentos críticos que antecedem a transmissão epigenética pela linhagem germinativa masculina podem estar envolvidos com a organização do sistema GABAérgico e contribuir para o aumento dos comportamentos semelhantes à ansiedade na prole adulta.

Vanaveski et al (2021) verificaram um aumento na expressão da subunidade α_2 na mesma região em camundongos modificados geneticamente para expressar maiores quantidades de PGC-1 α (um importante regulador da biogênese mitocondrial e do estresse celular) na região do hipocampo e córtex pré-frontal. Ainda segundo este estudo, o aumento da subunidade α_2 , co-localizada com gefirina em neurônios pós-sinápticos piramidais em CA1, favoreceu uma maior frequência de potenciais de ação em miniaturas, o que poderia estar relacionada ao maior número de sinapses GABAérgicas. Esta neurotransmissão GABAérgica mais acentuada, porém, foi seguida de comportamento ansiogênico nos testes de LCE e CCE, tanto em machos quanto nas fêmeas. O autor sugere que a superexpressão de PGC-1 α alterou o equilíbrio excitação/inibição na região do hipocampo, podendo influenciar outras regiões do encéfalo, o que poderia aumentar o número de sinapses inibitórias local. Ainda assim, o autor não estabelece uma relação causal direta entre a inibição alterada no circuito hipocampal causada pela superexpressão de PGC-1 α e o comportamento semelhante à ansiedade observado, sugerindo que mais estudos precisam ser realizados. Logo, o entendimento da ação da PGC-1 α e suas consequências para a neurotransmissão GABAérgica pode ser importante em diferentes distúrbios neuropsiquiátricos e outras doenças cerebrais (VANAVESKI et al., 2021).

Além disso, em nosso trabalho foi observado também que tanto a prole de camundongos machos quanto as fêmeas apresentaram um déficit na memória no teste de reconhecimento de objetos. Esse resultado foi semelhante ao verificado nos pais machos submetidos ao tratamento com PT que também refletiram uma redução da memória de curta duração no teste RO.

Ratos Sprague-Dawley submetidos ao protocolo de programação paterna tratados com cocaína, tiveram sua prole analisada na idade adulta. A prole de machos e fêmeas tiveram sua memória avaliada a partir do RO. O RO foi realizado com 30 minutos e 24h após a exposição aos objetos, avaliando, dessa forma, a memória de curta e longa duração. Foi verificado que a prole ratos machos dos pais tratados com cocaína, explorou igualmente ambos os objetos no teste com 30 min e 24 horas, quando um dos objetos era trocado de posição no aparato. Porém, quando um dos objetos era trocado por um novo, a prole explorava mais o objeto novo. Por sua vez, tanto a progênie feminina dos pais tratados com cocaína, quanto o grupo controle, dispenderam mais tempo com o objeto deslocado durante o teste de recuperação de memória realizado 24 horas após a primeira exposição. Do mesmo modo, a progênie feminina também apresentou memória normal

no RO durante um teste de memória de longo prazo. A memória de curto prazo não foi avaliada na progênie de fêmeas. Esses resultados sugerem que os déficits de memória relacionados à exposição paterna à cocaína foram específicos do sexo (WIMMER et al., 2017).

Sabe-se que a memória está relacionada às ações de alguns neurotransmissores, como o glutamato, acetilcolina, e também de algumas neurotrofinas, como, o BDNF. Porém, sabe-se que a atividade inibitória do sistema GABAérgico também pode influenciar negativamente a memória. Estudos em que foram utilizados roedores knockout para *Gad1*, foi verificado maior tempo de congelamento em um protocolo de medo condicionado, sugerindo que o GAD₆₇ é crucial para os mecanismos da extinção da memória (FUJIHARA et al., 2021).

É importante ressaltar que estudos relacionados à programação são mais estabelecidos sobre os insultos ambientais de origem materna e que podem, por sua vez, contribuir para o entendimento dos possíveis mecanismos epigenéticos envolvidos em protocolos de programação sobre a memória. Foi visto que a ativação imune materna durante a gestação, gerou prole que apresentou um piora da memória no teste de labirinto em Y. Foi visto também um aumento nos níveis da MeCP2, um tipo de enzima metilante que está relacionado à repressão transcricional, em neurônios GABAérgicos. Esses efeitos epigenéticos foram seguidos de redução da expressão dos transcritos de mRNA *Gad1* e *Gad2*, que poderia explicar os efeitos prejudiciais sobre a memória (LABOUESSE et al., 2015). Esses resultados vão de acordo com o trabalho realizado por Richetto et al (2013), que também verificou prejuízo na memória de trabalho na prole de mães submetidas à ativação imune materna, seguida de redução da expressão de GAD₆₅ e GAD₆₇ nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo dorsal, que são áreas criticamente envolvidas com a memória (RICHETTO et al., 2013).

A subunidade α_2 é notavelmente envolvida com os efeitos ansiolíticos, além de apresentar sensibilidade aumentada aos efeitos dos benzodiazepínicos (DIXON, ROSAHL e STEPHENS, 2008). Porém, podem ser encontrado trabalhos na literatura que associem esta subunidade à modulação da memória. Sabe-se que o uso de opioides tem sido relacionado a um maior risco de dependência, mortalidade relacionada a opioides e tolerância a analgésicos. Foi visto que o uso agudo de morfina levou a déficits na memória de trabalho espacial e a memória de curta duração no labirinto Y de Morris. Além disso, essas alterações foram acompanhadas do aumento na expressão gênica e do conteúdo proteico das subunidades α_2 , α_3 e α_5 na região do hipocampo. Porém, o uso de ácido

valpróico, um anticonvulsivante e estabilizador do humor, que eleva os níveis de GABA no encéfalo, reverteu as alterações observadas. A dependência da morfina e o aumento das subunidades do sistema GABAérgico, provavelmente, foi devido a saturação sináptica ocorrida por conta da forte conexão entre os sistemas de recompensa e aprendizado. Porém, novos estudos são necessários para entender se outros sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos (GHAMKHARINEJAD et al., 2021).

Dessa forma, podemos sugerir que a suprarregulação na expressão do gene *Gabra2*, responsável por codificar a subunidade α_2 do receptor GABA_A, pode estar relacionado as deficiências na memória apresentadas pela prole M. Por outro lado, esta alteração pode ter manifestado um perfil dimórfico, sendo necessário verificar as demais subunidades do receptor GABA_A e GABA_B que podem ter sido alteradas nas fêmeas, à fim de explicar as alterações apresentadas.

Por sua vez, tem sido observado que é a subunidade α_5 o foco dos estudos relacionados à memória quando se trata do sistema GABAérgico. Estas subunidades estão em maiores quantidades no hipocampo e em menor quantidade no córtex pré-frontal (CHARNEY e NESTLER, 2017). Camundongos knockout para a subunidade α_5 demonstraram desempenho melhorado no MWM, que é uma tarefa dependente do hipocampo, sem alterações no desempenho de tarefas não-dependentes do hipocampo e no comportamento semelhante à ansiedade (COLLINSON et al., 2002). O melhor desempenho veio acompanhado de menor amplitude, decaimento e lentidão das corrente pós-sináptica inibitória espontânea no hipocampo, sugerindo um mecanismo para a melhora da performance em *knockouts* para α_5 . Essa ação pode ser devida sua localização extrassináptica nos dendritos das células piramidais do hipocampo que, por sua vez, acaba exercendo uma importante função de inibição tônica sobre entradas glutamatérgicas. Essa inibição acaba por contrabalançar as entradas excitatórias realizadas por ação do receptor NMDA, podendo interferir na formação da memória (YEE et al., 2004).

Outro parâmetro avaliado foi o comportamento social através do teste de interação social. Como pode ser visualizado, a prole PT de camundongos machos tiveram um interesse social reduzido na 1^o etapa do teste, dispendendo menos tempo com o estímulo social, como pode ser visto pelo índice de sociabilidade reduzido. Por sua vez, na 2^o etapa do teste, pode ser verificado que a prole não possuiu preferência social pelo novo animal colocado no aparato. Esse resultado foi o mesmo que o encontrado nos pais submetidos ao tratamento com PT, sugerindo que esse comportamento pode ser transmitido para a prole. Por sua vez, pode ser visualizado que as fêmeas PT não discriminaram entre o

compartimento com o estímulo social e o não-social na 1^o etapa, assim como uma redução do índice de sociabilidade. Posteriormente, na 2^o etapa, a prole PT não diferenciou entre o estímulo social, já apresentado anteriormente, e o novo coespecífico, demonstrando uma redução no índice de preferência social quando comparado ao grupo controle. O menor tempo dispendido com o animal conhecido na segunda etapa, também pode sugerir que a prole apresentou um déficit de memória social (SILVERMAN et al., 2010). Esses resultados se assemelham com as alterações observados nos pais tratados com PT que apresentaram interações físicas reduzidas, sugerindo um certo grau de ansiedade social.

Estudos que associem programação paterna e seus efeitos sobre a capacidade de socialização da prole são escassos. Porém, em um estudo realizado por Saavedra-Rodriguez e Feig (2013), foi verificado que camundongos machos que passaram por estresse crônico gerado por instabilidade social durante a adolescência, não apresentaram um fenótipo mais ansioso, porém foi observado um comportamento social comprometido. Esse comportamento social reduzido foi caracterizado pelo menor tempo de sociabilidade, assim como a ausência de preferência social, verificado pelo teste de interação social. Esse perfil comportamental, por sua vez, foi transferido para a prole, que demonstrou que as fêmeas da geração F1 e F2, mas não os machos, tiveram aumentos dos comportamentos análogos à ansiedade, retraimento social e preferência social reduzida. Essas alterações foram seguidas de aumento na expressão dos genes *Rcan1* e *Rcan2* (inibidores de calcineurina), que tem sido relacionado na região do CA1 do hipocampo pelas gerações F1 e F2 de fêmeas. Logo, esses níveis elevados em CA1 ao longo das proles fêmeas sugerem que a elevação transgeracional induzido pelo estresse social na inibição da calcineurina pode contribuir para a distorção de como a região do hipocampo influencia a resposta ao estresse e/ ou comportamentos sociais ao longo das gerações (SAAVEDRA-RODRIGUEZ e FEIG, 2013).

Perturbações que acometam o sistema GABAérgico também podem contribuir para o comportamento social. Por sua vez, trabalhos envolvendo programações maternas são mais bem estabelecidos na literatura científica e, portanto, possuem trabalhos envolvendo o sistema gabaérgico e interação social. Fêmeas que eram administradas com ácido valpróico durante a gestação em um protocolo para indução de comportamento semelhante ao autismo em camundongos, geraram prole que tiveram redução do interesse social e da preferência social no teste de 3 câmaras de IS. Esse déficit social foi acompanhado de distúrbios no córtex dos sistemas glutamatérgico, gabaérgico, assim como do BNDF. Foram encontrados níveis reduzidos dos genes que codificam as

subunidades do receptor NMDA, como *NR2A*, *NR2B* e *NR2C*; dos genes que codificam as subunidades do receptor GABA_A, como *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra2*. Essa redução foi acompanhada de redução também do conteúdo proteico desses genes, além das proteínas GAD₆₅ e GAD₆₇, analisado por meio de *Western Blot*. O estudo sugere que a regulação negativa de BDNF contribuiu para a diminuição no conteúdo proteico glutamatérgico. Além disso, níveis reduzidos dos diferentes genes encontrados é típico da fisiopatologia do distúrbio do espectro autista (CHAU et al., 2017). Além disso, camundongos knockout para a subunidade NR1 do receptor NMDA, também apresentaram sociabilidade reduzida no teste de IS, além de alterações eletrofisiológicas no córtex auditivo e visual em um modelo de esquizofrenia (HALENE et al., 2009). Dessa forma, torna-se difícil excluir a hipótese de que um desequilíbrio no sistema glutamatérgico e GABAérgico possam ser moduladoras de patologias envolvendo déficits no comportamento social.

Atrasos no desenvolvimento de neurônios gabaérgicos durante o período do nascimento até a idade adulta foram visualizados em animais, com baixa interação social e ansiogênicos, nascidos de mães submetidas a um protocolo de estresse pré-natal. Neurônios gabaérgicos GAD67GFP+, no hipocampo e córtex pré-frontal, eram reduzidos no período do nascimento, porém durante a adolescência, foi verificado um aumento expressivo desses neurônios, sendo normalizados durante a idade adulta. O autor sugere que o estresse pré-natal pode ter levado ao atraso no povoamento, poda e diferenciação celular de células gabaérgicas contribuindo para as modificações comportamentais visualizadas na idade adulta (LUSSIER e STEVENS, 2016). Além disso, mães submetidas a ativação imune materna também levou a sociabilidade alterada na juventude na prole. Isso foi corroborado pelo o aumento de excitação do córtex cingulado anterior (CCa) causado pela hipofunção das sinapses inibitórias das células piramidais das camadas 2/3 do CAa verificado na prole. Por sua vez, a infusão direta de clonazepam no CCa restaurou os déficits sociais observados (OKAMOTO et al., 2018).

Ademais, alterações epigenéticas podem contribuir para deficiências no comportamento social. Isso pode ser visto na geração F1 de camundongos velhos (12 meses) e muito velhos (18 meses) quando comparado à prole de camundongos jovens (2 meses), que dispenderam menos tempo com o coespecífico no teste de IS. Esse comportamento foi mantido na geração F2 quando a prole de camundongos acasalou com fêmeas da geração F1 de pais velhos ou muito velhos. Essas alterações foram acompanhadas por mudanças no perfil de metilação de todo o genoma de espermatozoides dos pais envelhecidos podendo ser uma das razões das mudanças

observadas na prole (ZHAO et al., 2020). Além disso, um elegante estudo desenvolvido por Tyebji, Hannan e Tonkin (2020) verificou que a infecção patogênica por *Toxoplasma* causou alterações epigenéticas na linha germinativa masculina, modulando o fenótipo da prole por duas gerações. Essas alterações foram associadas à infecção causada pelo patógeno sobre as células do epidídimo e testículos, que são os locais onde ocorrem a maturação dos espermatozoides, devido a alteração da expressão de microRNAs, principalmente, naqueles que exercem funções anti-inflamatórias. Destaca-se, por sua vez, o miR-124, que atua regulando positivamente a sinalização de glutamato, bem como o comportamento social em camundongos, que foi regulado negativamente nos espermatozoides de pais infectados. Por outro lado, autor não verificou se essa alteração no perfil epigenético foi mantido na linha germinativa da prole F1 que foram utilizados para gerar a prole F2, restringindo a observação apenas para os efeitos multigeracionais, mas não transgeracionais (TYEBJI, HANNAN E TONKIN, 2020).

Em nosso trabalho, a prole de camundongos M e F apresentou um perfil ansiogênico na bateria de métodos comportamentais relacionados à ansiedade. Essas alterações comportamentais podem estar relacionadas às modificações neurobiológicas ocorridas no sistema GABAérgico no hipocampo, o que contribuiu, por sua vez, para a apresentação de um endofenótipo semelhante à ansiedade. Provavelmente, o perfil apresentado pela prole pode ter contribuído para uma redução do engajamento social, caracterizado por um aumento da ansiedade social. Ademais, as possíveis alterações ocorridas no sistema glutamatérgico podem ter levado a um desbalanço excitação-inibição em regiões encefálicas envolvidas com o comportamento social. Pelo fato do prejuízo ocorrido em receptores glutamatérgicos estarem implicados em algumas fisiopatologias que reduzem a comunicação social, como o transtorno do espectro autista, podemos sugerir que este sistema também pode ter sido modulado pela programação paterna. Além disso, podemos sugerir que a reduzida preferência social no 2º momento do teste de interação social, está relacionado não apenas à ansiedade social, mas à déficits de memória visual já apresentados no teste de RO, que podem refletir em dificuldades para o reconhecimento social. Por fim, a deficiência apresentada na capacidade de socialização e memória parecem ter sido herdadas do pai, sugerindo que mecanismos epigenéticos capazes de influenciar esses comportamentos, podem ter sido transmitidos na linhagem germinativa paterna para a descendência.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que o tratamento com propionato de testosterona foi capaz de alterar o comportamento paterno, além de afetar o desenvolvimento psicobiológico da prole na idade adulta. Dessa forma, foram verificadas as seguintes alterações:

- No aspecto cognitivo, refletido por um déficit de memória nos pais e transmitidos para a prole;
- No aspecto social, refletido por uma redução na sociabilidade dos pais e transmitidos para a prole;
- Na expressão de comportamentos afetivos, refletido em um perfil ansiogênico e antidepressivo na prole;
- Na redução da expressão de genes relacionados ao sistema GABAérgico hipocampal na prole.

Limitações

Durante a realização do presente trabalho algumas dificuldades foram impostas pela pandemia da Covid-19, como as restrições para o uso dos laboratórios durante um período do mestrado, o que contribuiu para os atrasos na realização dos experimentos e análises de biologia molecular. Consequentemente, essa condição influenciou também na entrega do trabalho dentro dos prazos estabelecidos pelo programa de pós-graduação.

Fontes de apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), assim como da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) através dos editais E-12/2019 e E-05/2020.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-RODRIGUEZ, Alexandra et al. Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. **Journal of neuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. e12590, 2018.

AIKEI J L; Nyby J G; Anmuth D. M; James P J. Testosterone Rapidly Reduces Anxiety in Male House Mice (*Mus musculus*). *Hormones and Behavior* 42, 448–460 (2002)

AIRES, M.M. - Fisiologia. Ed. Guanabara Koogan. 5ª edição, Rio de Janeiro, 2017

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALMEIDA, Osvaldo P. et al. Low free testosterone concentration as a potentially treatable cause of depressive symptoms in older men. **Archives of general psychiatry**, v. 65, n. 3, p. 283-289, 2008.

ANDERSON, Lucy M. et al. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition*, v. 22, n. 3, p. 327-331, 2006.

ANDREATINI, Roberto; BOERNGEN-LACERDA, Roseli; ZORZETTO FILHO, Dirceu. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: future perspectives. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ANTUNES, M.; BIALA, Grazyna. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.

ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARIKIAN, Steven R.; GORMAN, Jack M. A review of the diagnosis, pharmacologic treatment, and economic aspects of anxiety disorders. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 110, 2001.

ASADA, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R. G., Kanbara, N., ... & Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6496-6499

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências desvendando o sistema nervoso. 4. Porto Alegre: Artmed 2017.

BARRETO-ESTRADA J L; Barreto J; Fortis-Santiago y; Rivera-Ramos I; Fortis-Santiago A; Jorge J C. Modulation of Affect After Chronic Exposure to the Anabolic Steroid 17 α -Methyltestosterone in Adult Mice. *Behavioral Neuroscience*. 2004, Vol. 118, No. 5, 1071–1079

BARTLETT, Andrew A.; SINGH, Rumani; HUNTER, Richard G. Anxiety and epigenetics. **Neuroepigenomics in Aging and Disease**, p. 145-166, 2017.

BAXTER, Amanda J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological medicine**, v. 43, n. 5, p. 897-910, 2013.

BELMAKER, RH; AGAM, G. Major depressive disorder. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 55-68, 2008.

BITRAN D; Kellog C K; Hilvers R J. Treatment with an anabolic-Androgenic Steroid Affects Anxiety- Related Behavior and alters the Sensitivity of cortical Gabaa receptor in rat. *Hormones and Behavior* 27, 568-583 (1993).

BJØRNEBEKK, Astrid et al. Anabolic androgenic steroid use is associated with reduced brain derived neurotrophic factor in male weightlifters. 2022.

BODDEN, Carina et al. Intergenerational effects of a paternal Western diet during adolescence on offspring gut microbiota, stress reactivity and social behavior. **bioRxiv**, 2021.

BOFF, S.R. Esteróides anabólicos e exercício: ação e efeitos colaterais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 2010, vol. 18, nº. 1, p. 81-88. Disponível em:< <http://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/view/1316/1666>>. Acesso: 09/10/2011.

BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. Fisiologia Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015

BORKOVEC, T. D.; ABEL, Jennifer L.; NEWMAN, Heather. Effects of psychotherapy on comorbid conditions in generalized anxiety disorder. **Journal of consulting and clinical psychology**, v. 63, n. 3, p. 479, 1995.

BORTA, Andreas; SCHWARTING, Rainer KW. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 3, p. 387-396, 2005.

BRANDTNER, Maríndia; BARDAGI, Marucia. Sintomatologia de depressão e ansiedade em estudantes de uma universidade privada do Rio Grande do Sul. **Gerais: Revista Interinstitucional de Psicologia**, v. 2, n. 2, p. 81-91, 2009.

CAN, Adem et al. The tail suspension test. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 59, p. e3769, 2012.

CASTAGNÉ, Vincent et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*, v. 55, n. 1, p. 8.10 A. 1-8.10 A. 14, 2011.

CASTILLO, Ana Regina GL et al. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, p. 20-23, 2000.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMEDE, P. Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural brain research**, v. 85, n. 1, p. 27-35, 1997.

CHARNEY, Dennis S.; NESTLER, Eric J.; PAMELA SKLAR, M. D. (Ed.). **Charney & Nestler's neurobiology of mental illness**. Oxford University Press, 2017.

CHAU, Davor Kin-Fan et al. Downregulation of glutamatergic and GABAergic proteins in valproic acid associated social impairment during adolescence in mice. **Behavioural brain research**, v. 316, p. 255-260, 2017.

CLARK A S; Costine B A; Jones B L; Kelton-Rehkopf M C; Meerts S H; Nutbrown-Greene L L; Penatti C A A; Porter D M; Yang P; Henderson L P. Sex- and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions. **B R A I N R E S E A R C H** 1 1 2 6 (2 0 0 6) 1 2 2 – 1 3 8

COLLINSON, Neil et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the $\alpha 5$ subunit of the GABA_A receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 13, p. 5572-5580, 2002.

CORRÊA, Rafaela V. et al. Complete form of androgen insensitivity syndrome in Brazilian patients due to P766A mutation in the androgen receptor. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 1, p. 98-102, 2005.

CONSOLARO, Alberto. O gene e a epigenética: as características dentárias e maxilares estão relacionadas com fatores ambientais ou Os genes não comandam tudo! ou O determinismo genético acabou?. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 6, p. 14-18, 2009.

CORDÁS, Táki Athanássios. **Depressão: da bile negra aos neurotransmissores: uma introdução história**. Lemos Editorial, 2002.

COSTA, Zaquer Suzana Munhoz. **Ação da testosterona sobre o potencial de membrana das células de Sertoli. Envolvimento da via PLC-PIP2 sobre os canais de K**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

COSTANZO, L. Fisiologia. 5. Ed. Editores Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. Rio de

Janeiro: Elsevier, 2014.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CURI, Rui; ARAÚJO FILHO, Joaquim Procopio de. Fisiologia básica. In: Fisiologia básica. 2009. p. 882-882.

DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. **Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests**. New York:: Humana Press, 2009.

DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. Gametogênese Animal: Espermatogênese e Ovogênese.

DA SILVA, Mariluci Camargo Ferreira; FUREGATO, Antonia Regina Ferreira; DA COSTA JÚNIOR, Moacyr Lobo. Depressão: pontos de vista e conhecimento de enfermeiros da rede básica de saúde. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2003.

DAVIS, Susan R.; TRAN, Jane. Testosterone influences libido and well being in women. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 33-37, 2001.

DAY, Jonathan et al. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. **American Journal of Stem Cells**, v. 5, n. 1, p. 11, 2016.

DE ALMEIDA, Rosa MM et al. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. **European journal of pharmacology**, v. 526, n. 1-3, p. 51-64, 2005.

DE LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares; ISAAC, Cesar; FERREIRA, Marcus Castro. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. *Revista de Medicina*, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.

DE LIMA, Alisson Padilha; CARDOSO, Fabrício Bruno. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 9, n. 29, 2012.

DELOREY, Timothy M. et al. Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. **Behavioural brain research**, v. 187, n. 2, p. 207-220, 2008.

DELVILLE, Yvon; DE VRIES, Geert J.; FERRIS, Craig F. Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. **Brain, behavior and evolution**, v. 55, n. 2, p. 53-76, 2000.

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 06-11, 1999.

DE OLIVEIRA, Jaqueline Carvalho. Epigenética e doenças humanas. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 33, n. 1, p. 21-34, 2012.

DIETZ, David M. et al. Paternal transmission of stress-induced pathologies. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 408-414, 2011.

DINIZ, Gabriela de Almeida Rezende¹; MUNIZ, Bruno Vilela. USO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES E OS EFEITOS PSICOLÓGICOS.

DIXON, C. I.; ROSAHL, T. W.; STEPHENS, D. N. Targeted deletion of the GABRA2 gene encoding $\alpha 2$ -subunits of GABAA receptors facilitates performance of a conditioned emotional response, and abolishes anxiolytic effects of benzodiazepines and barbiturates. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 1-8, 2008.

DRAGICA, Selakovic; JOVANA, Joksimovic; GVOZDEN, Rosic. Behavioral Alterations of Supraphysiological Doses of Androgenic Anabolic Steroids—A mini review. Proceedings of the Nature Research Society, v. 2, n. 1, p. 02007, 2018.

DUCA, Ylenia et al. Substance abuse and male hypogonadism. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 5, p. 732, 2019.

EAGLE, Andrew L.; MAZEI-ROBISON, Michelle; ROBISON, Alfred J. Sucrose preference test to measure stress-induced anhedonia. **Bio Protoc**, v. 6, n. 11, p. 1822, 2016.

EDKINS, Robert Patrick. THE MODIFICATION OF THE DURATION OF DRUG ACTION: Pharmaceutical Considerations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 11, n. S1, p. 54T-66T, 1959.

EGASHIRA, Nobuaki et al. Depression-like behavior and reduced plasma testosterone levels in the senescence-accelerated mouse. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 1, p. 142-147, 2010.

ENNACEUR, Abdelkader. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural brain research**, v. 215, n. 2, p. 244-254, 2010.

ESPEJO, Emilio Fdez. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

FALKENSTEIN, Elisabeth et al. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 513-556, 2000.

FAN, Zhengxiao et al. Using the tube test to measure social hierarchy in mice. **Nature protocols**, v. 14, n. 3, p. 819-831, 2019.

FERREIRA, Urival Magno Gomes et al. Esteróides anabólicos androgênicos. *RbPS*, v. 20, n. 1, p. 267-275, 2007.

FERREIRA, A. R.; FRANCO, M. M. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v. 36, n. 3-9, 2012.

FONSECA, Pedro Emilio Rodrigues; COSTA JR, Cassio Valério; SILVEIRA, Bianca Ferreira. Epigenética e sua relação com algumas doenças. 2021.

FIELD, Andy. Descobrimo a estatística usando o SPSS. trad. **Lorí Viali. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.**

FRANCIS, Richard. **Epigenética: Como a ciência está revolucionando o que sabemos sobre hereditariedade.** Zahar, 2015.

FRYE, Cheryl A. et al. Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. **Hormones and behavior**, v. 54, n. 5, p. 726-734, 2008.

FRYE, Cheryl A.; WALF, Alicia A. Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. *Physiology & behavior*, v. 97, n. 2, p. 266-269, 2009

FUJIHARA, Kazuyuki et al. Genetic deletion of the 67-kDa isoform of glutamate decarboxylase alters conditioned fear behavior in rats. **FEBS Open bio**, v. 11, n. 2, p. 340-353, 2021.

GALHARDO, Vitor Ângelo Carlucio; MARIOSIA, Maria Aparecida Silva; TAKATA, João Paulo Issamu. Depressão e perfis sociodemográfico e clínico de idosos institucionalizados sem déficit cognitivo. 2010.

GAWEL, Kinga et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 392, n. 1, p. 1-18, 2019.

GHAMKHARINEJAD, Ghazaleh et al. Unconditioned and learned morphine tolerance influence hippocampal-dependent short-term memory and the subjacent expression of GABA-A receptor alpha subunits. **PloS one**, v. 16, n. 9, p. e0253902, 2021.

GLANOWSKA, Katarzyna M.; BURGER, Laura L.; MOENTER, Suzanne M.

Development of gonadotropin-releasing hormone secretion and pituitary response. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 45, p. 15060-15069, 2014.

GRECCO, Marcus Vinicius. Esteróides anabólicos no fisiculturismo. **Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício**, v. 7, n. 1, p. 21-28, 2009.

GRIMES, J. M., Ricci, L. A., & Melloni, R. H. (2003). Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) immunoreactivity in brains of aggressive, adolescent anabolic steroid-treated hamsters. *Hormones and behavior*, 44(3), 271-280.

GRIMES, Jill M.; MELLONI JR, Richard H. Prolonged alterations in the serotonin neural system following the cessation of adolescent anabolic-androgenic steroid exposure in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 6, p. 1242, 2006.

GRIMES, Jill M.; RICCI, Lesley A.; MELLONI JR, Richard H. Alterations in anterior hypothalamic vasopressin, but not serotonin, correlate with the temporal onset of aggressive behavior during adolescent anabolic-androgenic steroid exposure in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behavioral neuroscience*, v. 121, n. 5, p. 941, 2007.

GUILLOT, P. V., & CHAPOUTHIER, G. (1998). Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains. *Behavioural brain research*, 90(2), 203-206.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.– Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13ª ed., 2017.

HALENE, Tobias B. et al. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 7, p. 661-675, 2009.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, 2007.

HENIKOFF, Steven; SMITH, M. Mitchell. Histone variants and epigenetics. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a019364, 2015.

HODOSY, Július et al. The anxiolytic effect of testosterone in the rat is mediated via the androgen receptor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 2, p. 191-195, 2012.

HILL, L. E. et al. Voluntary exercise alters GABAA receptor subunit and glutamic acid decarboxylase-67 gene expression in the rat forebrain. **Journal of psychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 745-756, 2010.

JENSEN, Per. Transgenerational epigenetic effects on animal behaviour. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 113, n. 3, p. 447-454, 2013.

JIRTLE, Randy L.; SKINNER, Michael K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature reviews genetics**, v. 8, n. 4, p. 253-262, 2007

JUSZCZAK, Grzegorz R. et al. The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 2, p. 332-338, 2006.

KAATI, Gunnar; BYGREN, Lars Olov; EDVINSSON, Soren. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. **European journal of human genetics**, v. 10, n. 11, p. 682-688, 2002.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana et al. Assessment of social interaction behaviors. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 48, p. e2473, 2011.

KALININE, Eduardo. Efeitos comportamentais, neuroquímicos e metabólicos do tratamento com decanoato de nandrolona em camundongos. 2011.

KALUEFF, Allan V.; NUTT, David J. Role of GABA in anxiety and depression. **Depression and anxiety**, v. 24, n. 7, p. 495-517, 2007.

KAMEYAMA, Tsutomu; NABESHIMA, Toshitaka; KOZAWA, Teruo. Step-down-type passive avoidance-and escape-learning method: Suitability for experimental amnesia models. **Journal of pharmacological methods**, v. 16, n. 1, p. 39-52, 1986.

KANAYAMA, Gen; POPE JR, Harrison G. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 464, p. 4-13, 2018.

KAPRARA, Athina; HUHTANIEMI, Ilpo T. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: tales of mice and men. **Metabolism**, v. 86, p. 3-17, 2018

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. (Orgs.). Farmacologia básica e clínica. 13 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017.

KENNY, Anne M. et al. Effects of testosterone on behavior, depression, and cognitive function in older men with mild cognitive loss. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 1, p. M75-M78, 2004.

KOMADA, Munekazu; TAKAO, Keizo; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Elevated plus maze for mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 22, p. e1088, 2008.

KOUVELAS D; Pourzitaki C; papazisis G; Dagklis T; Dimou K; Kraus M M. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2008), 11, 925–934.

KUHN, Cynthia M. Anabolic steroids. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 411-434, 2002.

KURLING, Sanna et al. The effect of sub-chronic nandrolone decanoate treatment on dopaminergic and serotonergic neuronal systems in the brains of rats. **Brain research**, v. 1044, n. 1, p. 67-75, 2005.

LEGER, Marianne et al. Object recognition test in mice. **Nature protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531-2537, 2013.

LI, En; ZHANG, Yi. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 5, p. a019133, 2014.

LI, Yuanyuan. Transgenerational epigenetic regulation by environmental factors in human diseases. In: *Epigenetic Gene Expression and Regulation*. Academic Press, 2015. p. 209-222.

LIMA, Dênio. Depressão e doença bipolar na infância e adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 11-20, 2004.

LISCHINSKY, Julieta E.; LIN, Dayu. Neural mechanisms of aggression across species. **Nature neuroscience**, v. 23, n. 11, p. 1317-1328, 2020.

LOW, Karin et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 131-134, 2000.

LUEPTOW, Lindsay M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 126, p. e55718, 2017.

LUINE, Victoria. Recognition memory tasks in neuroendocrine research. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 158-164, 2015.

LUMIA, Augustus R.; THORNER, Kim M.; MCGINNIS, Marilyn Y. Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. **Physiology & behavior**, v. 55, n. 2, p. 331-335, 1994.

LUSSIER, Stephanie J.; STEVENS, Hanna E. Delays in GABAergic interneuron development and behavioral inhibition after prenatal stress. **Developmental neurobiology**, v. 76, n. 10, p. 1078-1091, 2016.

MARTINEZ-SANCHIS, S. et al. Effects of chronic treatment with testosterone propionate on aggression and hormonal levels in intact male mice. *Psychoneuroendocrinology*, v. 23, n. 3, p. 275-293, 1998.

MATRISCIANO, Francesco et al. Repeated anabolic androgenic steroid treatment causes antidepressant-reversible alterations of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, BDNF levels and behavior. *Neuropharmacology*, v. 58, n. 7, p. 1078-1084, 2010.

MAZZIO, Elizabeth A.; SOLIMAN, Karam FA. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*, v. 7, n. 2, p. 119-130, 2012.

MCHENRY, Jenna et al. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 35, n. 1, p. 42-57, 2014.

MCILWAIN, Kellie L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & behavior*, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.

MCINTYRE K L; Porter D M; Henderson L P. Anabolic androgenic steroids induce age-, sex, and dosedependent changes in GABAA receptor subunit mRNAs in the mouse forebrain. *Neuropharmacology* 43 (2002) 634–645

MELO, Roberto Laureano et al. Avaliação psicobiológica em camundongos swiss submetidos às manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico durante o período neonatal. 2017.

MICZEK, Klaus A. et al. Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behavioural brain research*, v. 125, n. 1-2, p. 167-181, 2001.

MIGUEL, Marina; MENEZES, Liliana; ARAÚJO, Eugênio. Western Blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, 2012.

MILLAN, Mark J.; LEJEUNE, Françoise; GOBERT, Alain. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in

the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 114-138, 2000.

MIYATA, Shigeo et al. Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice. **Molecular brain**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2021.

MORRISON T R; Ricci L A; Melloni Jr R H. Anabolic/androgenic steroid administration during adolescence and adulthood differentially modulates aggression and anxiety. **Hormones and Behavior** 69 (2015) 132–138.

MORRISON, Thomas R. et al. Serotonin type-3 receptors differentially modulate anxiety and aggression during withdrawal from adolescent anabolic steroid exposure. **Hormones and Behavior**, v. 119, p. 104650, 2020.

MOURA, Nélio Alfano. Esteróides anabólicos androgênicos e esportes: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 6, n. 1, 1984.

MOY, S. S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287-302, 2004.

MPHIL D S; Molde C H; Andreassen C S Torsheim T; Pallesen S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Annals of Epidemiology** 24 (2014).

NAGHDI, Nasser; NAFISY, Nastaran; MAJLESSI, Nahid. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. **Brain research**, v. 897, n. 1-2, p. 44-51, 2001.

NAGHDI, Nasser; MAJLESSI, Nahid; BOZORGMEHR, Tahereh. The effect of intrahippocampal injection of testosterone enanthate (an androgen receptor agonist) and anisomycin (protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in adult, male rats. **Behavioural brain research**, v. 156, n. 2, p. 263-268, 2005.

NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5995, Testosterone propionate" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone-propionate>. Accessed 6 January, 2022.

NASSAR, George N.; LESLIE, Stephen W. Physiology, testosterone. 2018.

NELSON, Randy J.; TRAINOR, Brian C. Neural mechanisms of aggression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 536-546, 2007.

NIKNAZAR, Somayeh et al. Parents' adulthood stress induces behavioral and hormonal alterations in male rat offspring. **Behavioural brain research**, v. 252, p. 136-143, 2013.

NIESCHLAG, Eberhard; BEHRE, Hermann M.; NIESCHLAG, Susan (Ed.). Testosterone: action, deficiency, substitution. Cambridge University Press, 2012.

OBLANDER J G; Henderson L. Corticotropin-Releasing Factor Modulation of Forebrain GABAergic Transmission has a Pivotal Role in the Expression of Anabolic Steroid-Induced Anxiety in the Female Mouse. *Neuropsychopharmacology* (2012) 37, 1483–1499

OBLANDER J G; Porter D M; Penatti C A A; Henderson L P. Anabolic Androgenic Steroid Abuse: Multiple Mechanisms of Regulation of GABAergic Synapses in Neuroendocrine Control Regions of the Rodent Forebrain. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 202–214.

ÖGREN, S. O.; STIEDL, Oliver. Passive avoidance. **Encyclopedia of psychopharmacology**, v. 2, p. 960-967, 2010.

OKAMOTO, Kazuki et al. GABAergic malfunction in the anterior cingulate cortex underlying maternal immune activation-induced social deficits. **Journal of neuroimmunology**, v. 321, p. 92-96, 2018.

O'LEARY, Olivia F.; CRYAN, John F. The tail-suspension test: a model for characterizing antidepressant activity in mice. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. p. 119-137.

OLESEN, J. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 1, p. 155-162, 2012.

OLIVARES E L; Silveira A L B; Fonseca F V; Silva-Almeida C; Côrtes R F; Pereira-Junior P P; Nascimento J H M; Reis L C. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. *Physiology & Behavior* 126 (2014) 15–24.

OLIVEIRA, Grazielle Pereira de. **Efeitos do uso decanoato de nandrolona em ratos submetidos ao treinamento físico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE), 2007.

OLSEN R W. Analysis of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptor Subtypes Using Isosteric and Allosteric Ligands. *Neurochem Res*. July 2014

ONAKOMAIYA, Marie M.; HENDERSON, Leslie P. Mad men, women and steroid cocktails: a review of the impact of sex and other factors on anabolic androgenic steroids effects on affective behaviors. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 4, p. 549-569, 2016.

OSBORNE-MAJNIK, Amber; FU, Qi; LANE, Robert H. Epigenetic mechanisms in fetal origins of health and disease. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 56, n. 3, p. 622, 2013.

PELEG-RAIBSTEIN, Daria; LUCA, Edlira; WOLFRUM, Christian. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. **Behavioural brain research**, v. 233, n. 2, p. 398-404, 2012

PELLOW, Sharon et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PIACENTINO D; Kotzalidis G D; Del Casale A; Aromantario, M R; Pomara C; Girard P; Sani G. Anabolic-androgenic Steroid use and Psychopathology in Athletes. A Systematic Review. *Current Neuropharmacology*, 2015, 13, 101-121

PIERETTI, Stefano et al. Brain nerve growth factor unbalance induced by anabolic androgenic steroids in rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 45, n. 1, p. 29-35, 2013.

PITTA, José Cássio do Nascimento. Transtornos de ansiedade. **RBM rev. bras. med**, v. 68, n. 12, 2011.

PITTS, Matthew W. Barnes maze procedure for spatial learning and memory in mice. *Bio-protocol*, v. 8, n. 5, 2018.

PLANT, Tony M. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary–gonadal axis. **Journal of endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T41-T54, 2015.

POPE JR, Harrison G. et al. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 35, n. 3, p. 341-375, 2014.

RAINER, Quentin et al. Chronic nandrolone decanoate exposure during adolescence affects emotional behavior and monoaminergic neurotransmission in adulthood. **Neuropharmacology**, v. 83, p. 79-88, 2014.

RAMOS, Renato Teodoro. Transtornos de ansiedade. **RBM rev. bras. med**, v. 66, n. 11, 2009.

RANG, H.P; DALE, M.M. Farmacologia. Editora Elsevier, 8a edição, 2016.

REIN, Benjamin; MA, Kaijie; YAN, Zhen. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. **Nature Protocols**, v. 15, n. 10, p. 3464-3477, 2020

RF SILVA, Fernando et al. The Anabolic Androgenic Steroid Testosterone Propionate Decreases Recognition Memory in Adult Male Rats. **Current Psychopharmacology**, v. 2, n. 3, p. 247-253, 2013.

RICCI, L. A., Morrison, T. R., & Melloni, R. H. (2013). Adolescent anabolic/androgenic steroids: Aggression and anxiety during exposure predict behavioral responding during withdrawal in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Hormones and behavior*, 64(5), 770-780.

RICHETTO, Juliet et al. Prenatal versus postnatal maternal factors in the development of infection-induced working memory impairments in mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 190-200, 2013.

RIVAS-ARANCIBIA, Selva; VAZQUEZ-PEREYRA, Francisca. Hormonal modulation of extinction responses induced by sexual steroid hormones in rats. **Life sciences**, v. 54, n. 21, p. PL363-PL367, 1994.

RIYAHY, Javad et al. Multigenerational effects of paternal spatial training are lasting in the F1 and F2 male offspring. **Behavioural Pharmacology**, p. 10.1097, 2022.

ROCHA, Madalena; AGUIAR, Fátima; RAMOS, Helena. O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos – uma epidemia silenciosa. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 9, n. 2, p. 98-105, 2014.

ROCHA, Vanessa de Moraes et al. Efeito do esteroide anabolico nandrolona sobre o nivel de ansiedade em ratos. 2006.

RODRIGUIZ, Ramona M. et al. Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. **Behavioural brain research**, v. 148, n. 1-2, p. 185-198, 2004.

ROJAS-ORTIZ, Y. A., Rundle-González, V., Rivera-Ramos, I., & Jorge, J. C. (2006). Modulation of elevated plus maze behavior after chronic exposure to the anabolic steroid 17 α -methyltestosterone in adult mice. *Hormones and behavior*, 49(1), 123-128.

ROTH, Kevin A.; KATZ, Richard J. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247-263, 1980.

SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, Lorena; FEIG, Larry A. Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 44-53, 2013.

SALVADOR, A. et al. Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice. **Perceptual and motor skills**, v. 88, n. 1, p. 319-328, 1999.

SANDHU, K. V.; YANAGAWA, Y.; STORK, O. Transcriptional Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase in the Male Mouse Amygdala by Dietary Phyto-Oestrogens. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 4, p. 285-292, 2015.

SCHWARTZER, Jared J.; RICCI, Lesley A.; MELLONI JR, Richard H. Interactions between the dopaminergic and GABAergic neural systems in the lateral anterior hypothalamus of aggressive AAS-treated hamsters. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 1, p. 15-22, 2009.

SECO, Sandra; MATIAS, Alexandra. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de barker Fetal origins of adult disease: revisiting barkers theory. *Acta Obstet Ginecol Port*, v. 3, n. 3, p. 158-168, 2009.

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 96, p. e52434, 2015.

SEIDMAN, Stuart N.; SPATZ, Erica; ROOSE, Steven P. Testosterone replacement therapy for hypogonadal men with major depressive disorder: a randomized, placebo-controlled clinical trial. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 20806, 2001.

SELAKOVIC, Dragica et al. The impact of hippocampal sex hormones receptors in modulation of depressive-like behavior following chronic anabolic androgenic steroids and exercise protocols in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 13, p. 19, 2019.

SHAHIDI, Nasrollah T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical therapeutics*, v. 23, n. 9, p. 1355-1390, 2001.

SIEVER, Larry J. Neurobiology of aggression and violence. **American journal of psychiatry**, v. 165, n. 4, p. 429-442, 2008.

SILVA, Paulo Rodrigo Pedroso da; DANIELSKI, Ricardo; CZEPIELEWSKI, Mauro Antônio. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 8, p. 235-243, 2002.

SILVERMAN, Jill L. et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490-502, 2010.

SINGEWALD, Nicolas. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 1, p. 18-40, 2007.

SKINNER, Michael K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 838-842, 2011

SOUBRY, Adelheid. Epigenetic inheritance and evolution: a paternal perspective on dietary influences. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 118, n. 1-2, p. 79-85, 2015.

STERU, Lucien et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

SZYF, Moshe. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in molecular medicine*, v. 21, n. 2, p. 134-144, 2015.

THIBLIN, Ingemar et al. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *British journal of pharmacology*, v. 126, n. 6, p. 1301-1306, 1999.

TREIT, Dallas; MENARD, Janet; ROYAN, Cary. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology biochemistry and behavior*, v. 44, n. 2, p. 463-469, 1993.

TYEBJI, Shiraz; HANNAN, Anthony J.; TONKIN, Christopher J. Pathogenic infection in male mice changes sperm small RNA profiles and transgenerationally alters offspring behavior. *Cell Reports*, v. 31, n. 4, p. 107573, 2020.

VANAVESKI, Taavi et al. PGC-1 α signaling increases GABA (A) receptor subunit α 2 expression, GABAergic neurotransmission and anxiety-like behavior in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 14, p. 588230, 2021.

VERMEULEN, A. Longacting steroid preparations. *Acta Clinica Belgica*, v. 30, n. 1, p. 48-55, 1975

VIEIRA, Gilberto Cavalheiro. Admirável mundo novo: epigenética. *Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino*. Porto Alegre, Editora Fi, p. 177-212, 2017.

VILLOTA-SALAZAR, Nubia Andrea; MENDOZA-MENDOZA, Artemio; GONZÁLEZ-PRIETO, Juan Manuel. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science*, v. 9, n. 4, p. 347-370, 2016.

WALKER, Elizabeth Reisinger; MCGEE, Robin E.; DRUSS, Benjamin G. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 334-341, 2015.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WIMMER, M. E. et al. Paternal cocaine taking elicits epigenetic remodeling and memory deficits in male progeny. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 11, p. 1641, 2017.

YANAI, Shogo et al. Gene expression and functional abnormalities in XX/Sry Leydig cells. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021

YANG, P., Jones, B. L., & Henderson, L. P. (2005). Role of the α subunit in the modulation of GABA A receptors by anabolic androgenic steroids. *Neuropharmacology*, 49(3), 300-316.

YEE, Benjamin K. et al. GABAA receptors containing the $\alpha 5$ subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 1928-1936, 2004.

ZHAO, Wen-Long et al. Autism-like behaviors and abnormality of glucose metabolism in offspring derived from aging males with epigenetically modified sperm. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 19, p. 19766, 2020.

ZHOU, Rong et al. Persistent overexpression of DNA methyltransferase 1 attenuating GABAergic inhibition in basolateral amygdala accounts for anxiety in rat offspring exposed perinatally to low-dose bisphenol A. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 10, p. 1535-1544, 2013.

ZHU, Chunting et al. Involvement of epigenetic modifications of GABAergic interneurons in basolateral amygdala in anxiety-like phenotype of prenatally stressed mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 6, p. 570-581, 2018.

ZOGHBI, Huda Y.; BEAUDET, Arthur L. Epigenetics and human disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 2, p. a019497, 2016.

ZOTTI, Margherita et al. Chronic nandrolone administration induces dysfunction of the reward pathway in rats. **Steroids**, v. 79, p. 7-13, 2014