

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**RAUL DORNELES LEÃES**

**INIBIÇÃO DA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE POR 1-METIL-TRIPTOFANO  
ATENUA O COMPORTAMENTO AGRESSIVO INDUZIDO PELO TRATAMENTO  
COM ESTANOZOLOL EM CAMUNDONGOS**

**Itaqui**

**2016**

**RAUL DORNELES LEÃES**

**INIBIÇÃO DA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE POR 1-METIL-TRIPTOFANO  
ATENUA O COMPORTAMENTO AGRESSIVO INDUZIDO PELO TRATAMENTO  
COM ESTANOZOLOL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Nutrição.

**Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse**

**Itaqui**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

L433i Leães, Raul Dorneles

Inibição da Indoleamina 2,3-dioxigenase por 1-metil-triptofano atenua o  
comportamento agressivo induzido pelo tratamento com Estanozolol em  
camundongos. / Raul Dorneles Leães.

37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação) – Universidade  
Federal do Pampa, NUTRIÇÃO, 2016.

"Orientação: Cristiao Ricardo Jesse".

1. Agressividade. 2. Estanozolol. 3. Indoleamina 2,3-dioxigenase. 4. 1-  
metil-triptofano. 5. Esteróide anabólico androgênico.

**RAUL DORNELES LEÃES**

**INIBIÇÃO DA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE POR 1-METIL TRIPTOFANO  
ATENUA O COMPORTAMENTO AGRESSIVO INDUZIDO PELO TRATAMENTO  
COM ESTANOZOLOL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Nutrição da Universidade Federal  
do Pampa, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Bacharel em Nutrição.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 15 de novembro de 2016.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Orientador

UNIPAMPA

---

Prof. Dra. Silvana Peterini Boeira

UNIPAMPA

---

Mestre André Rossito Goes

UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jandira e Juarez, que tornaram possível esse momento. Que sempre apoiaram as minhas decisões e me fortaleceram nos momentos de fraqueza.

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente agradeço a Deus Pai, Filho e Espírito Santo. Por ter me escolhido como um de seus filhos e por sua proteção. Concebendo experiências magníficas em minha vida e me tornando mais forte a cada aprendizado dos erros por mim cometidos.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse pela transmissão de conhecimentos desde o primeiro semestre até agora e especialmente por me acolher, orientar e auxiliar. Possibilitando o desenvolvimento deste trabalho, que foi uma experiência inédita e de extrema importância na minha formação.

A minha banca formada pela Prof. Dra. Silvana Peterini Boeira e ao meu amigo e Mestre André Rossito Goes, por disponibilizarem-se a assistir e corrigir meu trabalho durante um feriado.

Aos colegas Maicon Lenon Otênio de Brito e Marcelo Gomes de Gomes por estarem envolvidos nos experimentos deste estudo.

## RESUMO

Esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) são compostos sintéticos derivados da testosterona. Possuem efeitos que intensificam a construção de tecidos e as características masculinas. Em busca de aumento da força, ganho de massa corporal e por apelo estético, estas substâncias são utilizadas indiscriminadamente por adolescentes e por atletas em esportes de alto rendimento. Porém, evidências crescentes propõem que estas drogas trazem efeitos secundários indesejáveis, tais como perda do controle de impulso e aumento da agressividade e violência. O envolvimento da serotonina (5-HT, 5hidroxitriptamina) com o comportamento agressivo é de grande relevância. No primeiro passo da via das quinureninas (VQ), a enzima IDO (indoleamina 2,3dioxigenase) tem função de regular a relação de conversão de TRP (triptofano) em quinurenina (QUIN). Um aumento na atividade desta enzima pode resultar na redução de TRP e aumentar QUIN, com conseqüente redução de 5-HT e aumento de outros metabólitos como o ácido quinólico (AQ) que possui efeito tóxico no sistema nervoso central (SNC), causando inflamações. No presente estudo, investigamos se o inibidor da IDO o 1-MT (1-metiltriptofano) é capaz de reverter os efeitos comportamentais e neuroquímicos causados pelo tratamento com Estanozolol (50mg / kg / dia) em camundongos.

Palavras-chave: Agressividade, esteroide anabólico androgênico, indoleamine 2,3dioxigenase, estanozolol, 1-metil-triptofano.

## ABSTRACT

Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic compounds derived from testosterone. They have effects that intensify a fabric construction and as masculine characteristics. In search of increased strength, body mass gain and aesthetic appeal, these substances are used indiscriminately by adolescents and athletes in high-performance sports. However, growing evidence suggests that these drugs bring undesirable side effects, such as loss of impulse control and increased aggressiveness and violence. The involvement of serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) with aggressive behavior of great relevance. In the first step of kynurenine pathway (KP), an IDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) enzyme has a function of regulating a conversion ratio of TRP (tryptophan) to quinurenine (QUIN). An increase in enzyme activity may result in the reduction of TRP and increase QUIN, with consequent reduction of 5-HT and increase of other metabolites such as quinolic acid (AQ) that has a toxic effect on the central nervous system (CNS), causing inflammations. (1-methyltryptophan) is able to revert the behavioral and neurochemical effects caused by treatment with Stanozolol (50mg / kg / day) in mice.

**Keywords:** Aggressiveness, anabolic androgenic steroid, indoleamine 2,3-dioxygenase, stanozolol, 1-methyltryptophan.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental .....	4
Figura 2A – Latência de ataques no teste intruso-residente .....	7
Figura 2B – Número de ataques no teste intruso-residente .....	8
Figura 2C – Atividade locomotora no teste de campo aberto .....	9
Figura 3A – Níveis de 5-HT no hipocampo .....	9
Figura 3B – Níveis de 5-HIAA no hipocampo .....	10
Figura 3C – Relação 5-HIAA / 5-HT no hipocampo .....	10
Figura 3D – Níveis de 5-HT no córtex pré-frontal .....	11
Figura 3E – Níveis de 5-HIAA no córtex pré-frontal .....	11
Figura 3F – Relação 5-HIAA / 5-HT no córtex pré-frontal .....	12
Figura 4A – Níveis de triptofano no hipocampo .....	12
Figura 4B – Níveis de QUIN no hipocampo .....	13
Figura 4C – Relação QUIN / TRP no hipocampo .....	13
Figura 4D – Níveis de triptofano no córtex pré-frontal .....	14
Figura 4E – Níveis de QUIN no córtex pré-frontal .....	14
Figura 4F – Relação QUIN / TRP no córtex pré-frontal .....	15
Figura 5A – Atividade de IDO no hipocampo .....	15
Figura 5B – Atividade de IDO no córtex pré-frontal .....	16
Figura 6A – Níveis de AQ no hipocampo .....	17
Figura 6B – Níveis de AQ no córtex pré-frontal .....	17
Figura 7A – Peso do músculo gastrocnêmio .....	18
Figura 7B – Níveis de corticosterona no sangue .....	18

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

1-MT - 1-metil-triptofano

5-HT - 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HIAA - ácido 5-hidroxi-indoleacético

VQ – Via das Quinureninas

AQ – Ácido quinólico

CPF – Córtex Pré-frontal

EAA – Esteroide anabólico androgênico

HIPP – Hipocampo

CLAR - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

QUIN - Quinurenina

EST - Estanozolol

SNC – Sistema Nervoso Central

TRP – Triptofano

i.p – intraperitoneal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 METODOLOGIA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Animais .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Reagentes .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Desempenho experimental e administração de fármacos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.4 Teste em campo aberto .....</b>	<b>4</b>
<b>2.5 Teste do Intruso-residente .....</b>	<b>4</b>
<b>2.6 Biomarcadores de alterações humorais e neuroquímicas .....</b>	<b>5</b>
<b>2.7 Determinação da atividade IDO .....</b>	<b>6</b>
<b>2.8 Ensaio de corticosterona sérica .....</b>	<b>6</b>
<b>2.9 Análise estatística .....</b>	<b>6</b>
<b>3. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Avaliação comportamental no Teste intruso-residente .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 Avaliação locomotora em teste de campo aberto .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Determinação no hipocampo e córtex pré-frontal .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4 Discussão .....</b>	<b>19</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os esteroides androgênicos anabólicos (EAA) são compostos sintéticos derivados da testosterona. A ligação da testosterona em receptores de andrógenos, tem efeitos anabólicos (construção de tecidos) e androgênicos (características masculinas) (BHASIN et al., 1996), também promovem a síntese proteica pelo processo de transcrição, limitando o catabolismo proteico devido à ação do antagonista de glicocorticoides (KERSEY et al., 2012). Do ponto de vista clínico, são comumente prescritos em baixas dosagens para o tratamento de várias desordens, tais como as síndromes de deficiência androgênica (CONWAY et al., 2000), catabolismo relacionado a caquexia no câncer (LANGER et al., 2001), disfunções metabólicas induzidas por queimadura grave (HART et al., 2001).

Estanozolol (EST) é um derivado alquilado  $17\alpha$ -sintética de testosterona, que apresenta uma maior potência anabólica e uma degradação hepática mais lenta do que a testosterona (NASROLLAH & SHAHIDI, 2001). Devido ao EST não promover aromatização e nem retenção hídrica, seu uso é muito comum por fisiculturistas em períodos próximos a competição, com o intuito de adquirir densidade muscular sem correr o risco de acumular líquidos (SANTO, 2006). Segundo SILVA & MOREAU (2003) no Brasil a prática de musculação tornou-se padrão cultural entre os jovens. A partir da década de 80 este EAA incidiu entre os esportes de alto rendimento, sendo utilizado indiscriminadamente por atletas e até mesmo por jovens praticantes de musculação, que desejam ganhos de força e resistência, promoção da autoestima e para fins estético (TUCCI et al., 2012; EATON et al., 2012; HARMER, 2010). Consequentemente, há uma grande ocorrência de efeitos colaterais com usuários de EAAs, como problemas cardiovasculares e hepáticos, disfunção gonadal e desenvolvimento de acne (CHARLOTTE et al., 2003). Além de efeitos físicos, o uso abusivo de EAAs trazem diferentes alterações psiquiátricas secundárias de alteração humoral, tais como euforia, aumento da autoestima, transtorno explosivo intermitente e aumento da violência (THIBLIN, I. & PARLKLO, T., 2003).

O comportamento agressivo está associado a disfunções do sistema serotoninérgico (SEO et al., 2008). A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é o neurotransmissor mais estudado no controle de formas patológicas do comportamento agressivo (TAKAHASHI et al., 2011). Quando o triptofano (TRP) é degradado na via da quinureninas (VQ), os seus produtos são 5-HT e ácido quinolínico (AQ) (SCHWARCZ et al., 2012). A enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) tem função de regular o primeiro passo da VQ, que consiste na conversão

de TRP em quinurenina (QUIN), um aumento na atividade desta enzima pode resultar na redução de TRP e aumentar QUIN, com conseqüente redução de 5-HT (COCCARO et al., 2015). Distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos estão associados à desregulação da VQ, resultando em baixa ou alta produção de seus metabólitos ativos (CORNAI et al., 2011; SCHWARCZ et al., 2012). Geralmente, a menor atividade de 5-HT está ligada ao comportamento agressivo (COMAI et al., 2016). Estudos mostraram consistentemente que os EAAs aumentam a agressividade em modelos animais (MELLONI & RICCI, 2010; ROBINSON et al., 2012; KALININE et al., 2014).

Este estudo avaliou a hipótese de que o 1-MT (inibidor competitivo de IDO), possui efeito anti-agressivo e capacidade de reverter as alterações neuroquímicas e comportamentais possivelmente causadas pelo tratamento com o EST em camundongos. Assim, avaliou-se o comportamento agressivo através do teste Intruso-residente e atividade locomotora em teste de campo aberto. Além disso, verificou-se as alterações neuroquímicas mensurando os níveis de TRP, QUIN, AQ, 5-HT, ácido hidroxindoleacético (5-HIAA), a relação TRP / QUIN, 5-HIAA / 5-HT e atividade enzimática IDO no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo (HIPPO).

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Animais**

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos C57BL / 6 machos (25-35 g, 3-6 meses de idade). Os animais foram mantidos a 22-25°C com acesso livre à água e aos alimentos, sob um ciclo claro / escuro de 12:12 h, com luzes acesas às 7:00 da manhã. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados. As manipulações experimentais foram realizadas durante a fase de luz do dia. Os procedimentos deste estudo foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Cuidados e Uso de Recursos de Animais Experimentais e com a aprovação do Comitê Ético de Uso Animal (Protocolo CEUA nº 002/2015) da Universidade Federal de Pampa.

### **2.2 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

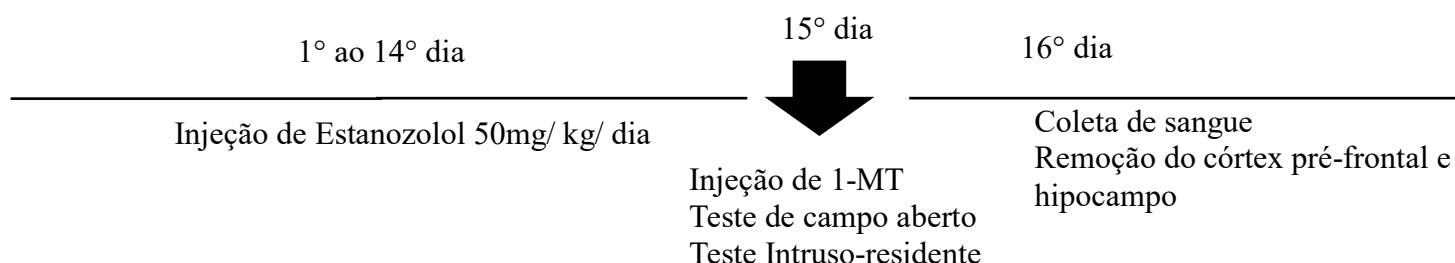
### **2.3 Desenho experimental e administração de fármacos**

As gaiolas dos camundongos foram alocadas em um dos seguintes grupos; Residente ou intruso. As gaiolas de camundongos residentes foram atribuídas aos grupos de tratamento. Os animais receberam injeções subcutâneas diárias de EST (50 mg / kg / dia, em um volume de 1 ml / kg, dissolvido em óleo de milho) durante 14 dias. Todos os camundongos deste estudo foram alocados individualmente, esta estratégia evita que os camundongos intrusos estabeleçam a dominância social sobre os camundongos residentes antes do teste do intruso. A dose e o regime de tratamento basearam-se no trabalho publicados anteriormente de LE GREVES et al. (1997). Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos durante a fase clara, das 9h às 15h, enquanto que a administração de EST foi das 15h às 16h. Assim, a última injeção foi realizada no dia anterior às experiências comportamentais e neuroquímicas.

O 1-metil-triptofano (inibidor de IDO, 1-MT) foi dissolvido em solução salina à 0,9% e administrado por via intraperitoneal (i.p.), utilizando um único volume de injeção de 10 ml / kg. O tempo de concentração máxima (60 min) no cérebro de camundongos após a administração de 1-MT foi escolhido com base no trabalho de KOTERMANSKI et al.

(1993). O tempo e o regime de dose de 1-MT (1 mg/kg) foram baseados em trabalhos anteriores publicados de SOUZA et al. (2016).

Figura 1 – Delineamento experimental.



#### 2.4 Teste em campo aberto

Os animais (n = 6 por grupo) foram testados quanto à atividade espontânea e locomotora utilizando um aparelho de caixa preta 50 cm × 50 cm × 50 cm. Os experimentos foram conduzidos em uma sala com som atenuado sob luz de baixa intensidade (12 lx). Os animais foram colocados no canto direito da arena e a atividade locomotora foi registrada com uma câmera de vídeo durante 10 minutos (PRUT & BELZUNG, 2003). Todas as análises foram realizadas utilizando um sistema de rastreamento operado por computador (Any-maze, Stoelting, Woods Dale, IL). Adicionalmente, o grupo STA +1-MT e veículo + 1-MT receberam uma injeção i.p de 1-MT, 60 minutos antes do teste de campo aberto conforme o trabalho de KOTERMANSKI et al. (2013)

#### 2.5 Teste do intruso residente

Neste teste, o comportamento agressivo é testado introduzindo um camundongo intruso na gaiola de um residente. Como esperado, os moradores são tipicamente mais agressivos porque estão familiarizados com o meio ambiente e estão defendendo seu território de origem (NELSON & TRAINOR, 2007). No caso do camundongo intruso atacar primeiro o residente ou apresentar um perfil ofensivo exacerbado, ambos os animais foram excluídos da análise e não foram novamente testados. Assim, todos os residentes que atacam o intruso foram considerados dominantes. O teste foi realizado durante a fase de luz, no conceito proposto

de que as fases claras ou escuras produzem resultados confiáveis nos testes de comportamento social (YANG et al., 2008).

Dois dias antes do teste do intruso, a serratagem das gaiolas dos camundongos residentes não foram alteradas para que os animais estabelecessem territorialidade dentro da sua gaiola doméstica. O intervalo de tempo entre cada teste em animais foi de 15 min, incluindo a primeira habituação de 2 min. As observações de status dominante e subordinado, latência ao primeiro ataque agressivo e o número de ataques do residente para o intruso foram registrados durante um período de 10 minutos máximo. Neste trabalho, um ataque foi definido como um ataque de atividade (luta) que dura até vários segundos, no qual o camundongo residente morde o intruso pelo menos uma vez. Os comportamentos avaliados que podem ser exibidos por camundongos consistem em um ataque de um lado fixo, ataque frontal, perseguição, lutar, lunge ou boxe infligido pelo morador contra o intruso. Estes componentes foram então registados como o número de atos agressivos.

Os intrusos não receberam qualquer tratamento e foram alojados em gaiolas juntamente com outros intrusos, diferentemente dos residentes que foram alocados individualmente. Por razões éticas, todos os camundongos foram submetidos somente uma vez ao teste e se o comportamento agressivo colocou os animais em risco de lesões como sangue ou sofrimento o teste foi interrompido antes da duração máxima do teste de 10 minutos (DEFENSOR et al., 2012).

## **2.6 Biomarcadores de alterações hormonais e neuroquímicas: Análise das concentrações de 5-HT, 5-HIAA, TRP, QUIN e AQ por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR)**

Os níveis de 5-HT, 5-HIAA, TRP, QUIN e AQ foram mensurados em amostras do córtex pré-frontal e hipocampo através da CLAR. A fase móvel continha 50 nM de ácido acético glacial, 100 mM de acetato de zinco e 3% de acetonitrilo dissolvido em água NANOpure duplamente desidratada CLAR de grau H<sub>2</sub>O. O pH foi ajustado para 4,9, utilizando NaOH 5M. O tecido do hipocampo foi sonificado em 1 ml de fase móvel contendo 7% de ácido perclórico com 50 ng / 20 µl de N-metil 5-HT como padrão interno. Os homogenatos de hipocampo foram centrifugados a 20.000 rpm durante 20 min e os sobrenadantes foram colocados em novos tubos eppendorf, utilizando uma seringa equipada com um filtro de 0,45 µm (phenomenex). Injetaram-se 20 µl do sobrenadante filtrado utilizando um auto-amostrador Waters e uma coluna analítica de fase inversa (coluna



Kinetex™ Core Shell Technology com área específica de 4,6 mm e tamanho de partícula de 2,6 µl de Phenomenex) para separação de metabolitos. Um detector PDA-UV (Shimadzu SPD-M10A VP), calibrado para integrar a 230 e 250 nm, bem como um detector fluorescente (detector de fluorescência Shimadzu RF-20A XS), ajustado para comprimento de onda de excitação de 254 nm; Comprimento de onda de emissão 404 nm, foram utilizados para detectar os metabolitos. Cromatógrafos foram gerados pelo software CLASSVP (Shimadzu). Os resultados são expressos como nmol / h / mg de proteína.

### **2.7 Determinação da atividade IDO**

A atividade IDO foi determinada como descrito anteriormente, com pequenas modificações (ZWILLING et al., 2011). Para determinar atividade de IDO, incubou-se homogenato de hipocampo e cortex pré-frontal de camundongos (50 µl) com 200 µl de tampão de ensaio (400 mM de L-triptofano, 20 mM de ascorbato, 10 µM de azul de metileno, 100 µg de catalase em 50 mM de fosfato de potássio Tampão pH 6,5) a 37 °C durante 1 h. Parou-se a reação por adição de 50 µl de solução de ácido sulfosalicílico a 10% (SSA) e depois incubou-se durante mais 30 minutos a 50 °C para hidrolisar a N-formilcinurenina em L-cinurenina. A mistura reacional foi então centrifugada a 13 000 g durante 10 min a 4 °C e filtrada através de tubos de filtro 0,2 µm a 13 000 g durante 5 min. QUIN foi analisado por CLAR, como descrito por FILHO et al. (2016). Os resultados são expressos como nmol QUIN / h / mg de proteína.

### **2.8 Ensaio de corticosterona sérica**

O sangue foi coletado em gelo e separado numa centrífuga refrigerada a 4 °C (4000 g durante 10 min). O plasma foi armazenado a -20 °C até os ensaios serem realizados. Os níveis séricos de corticosterona foram medidos utilizando um kit comercial baseado no ensaio imunoenzimático (FILHO, et al., 2016). Os níveis plasmáticos de corticosterona foram expressos em nmol / ml.

### **2.9 Análise estatística**

A distribuição de dados foi verificada pela aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados são apresentados como médias ± meio de erro padrão (SEM). As comparações entre os grupos experimental e de controle foram realizadas por análise de variância

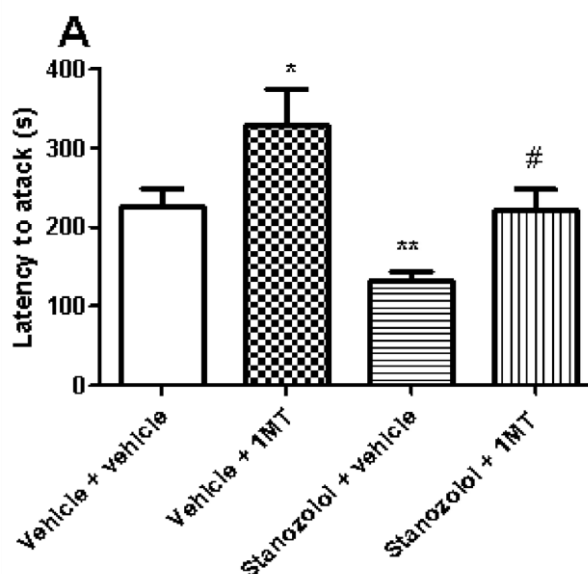
unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste Tukey post hoc ou ANOVA bidirecional, seguido do teste post hoc de Bonferroni, quando apropriado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

### 3. APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação comportamental no Teste intruso-residente

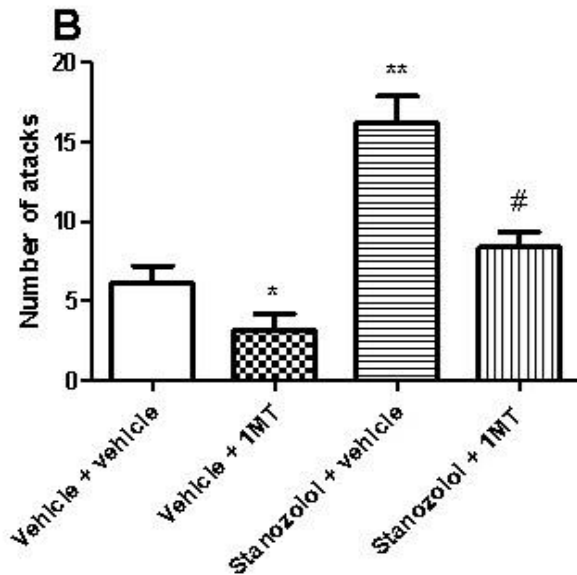
A ANOVA de duas vias mostrou efeito principal significativo para uma interação STA [F (1,32) = 9,62,  $p < 0,01$ ], 1-MT [F (3,32) = 3,05,  $p < 0,05$ ] = 5,89,  $p < 0,002$ ] na latência de ataque (Fig. 2A).

Figura 2A – Latência dos ataques no teste Intruso-residente. \*Comparação do grupo Controle + 1MT com Controle no  $p < 0,05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0,01$ . # Comparação do grupo STA + 1-MT com STA+ Controle no  $p < 0,05$ .



A administração de 1MT impediu um aumento do número de ataque em relação ao controle (Fig. 2B).

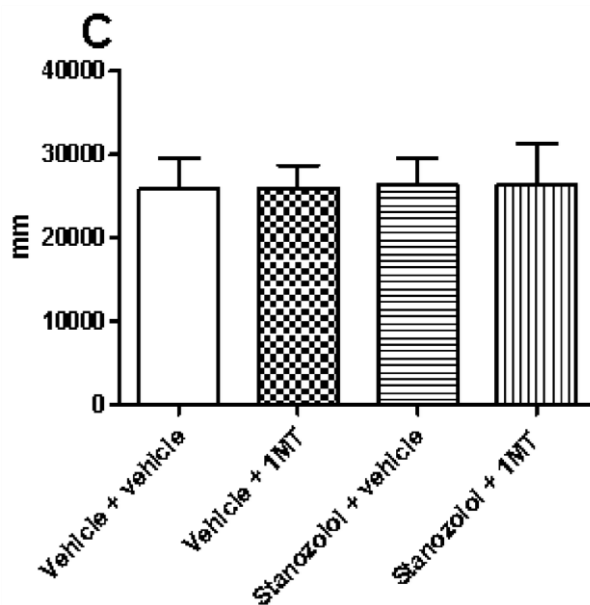
Figura 2B – Número de ataques no teste Intruso-residente. \*Comparação do grupo Controle + 1MT com Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . # Comparação do grupo STA + 1-MT com STA+ Controle no  $p < 0.05$ .



### 3.2 Avaliação locomotora em teste de campo aberto

A fig. 2C mostra o efeito dos tratamentos STA e 1-MT sobre o desempenho no teste de campo aberto. A ANOVA de duas vias revelou que a distância total neste teste não se alterou em todos os grupos: STA ( $F(1,36) = 1,57$ ,  $p < 0,22$ ), 1-MT ( $F(1,36) = 0,05$ ,  $p < 0,95$ ). Diante deste teste pode ser possível notar que os tratamentos (STA e 1-MT) não causam excitação ou sedação em animais.

Figura 1C – Atividade locomotora no teste de campo aberto.



### 3.3 Determinação no hipocampo e córtex pré-frontal

O teste de Newman-Keuls reavaliou que o EST induziu uma diminuição significativa nos níveis 5HT e 5-HIAA (Fig. 3A, 3B, 3D e 3E) no hipocampo e córtex pré-frontal em comparação com o grupo controle. O tratamento com 1-MT não promoveu a prevenção da diminuição dos níveis de 5HT e 5-HIAA no hipocampo e no córtex pré-frontal ocasionados pelo EST quando comparado ao grupo controle. A relação 5-HIAA / 5-HT foi aumentada nos grupos STA e STA + 1MT no córtex pré-frontal (Fig. 3F).

Figura 3A – Níveis de 5-HT no hipocampo. \*\*Comparação dos grupos STA + Controle e STA + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.01$ .

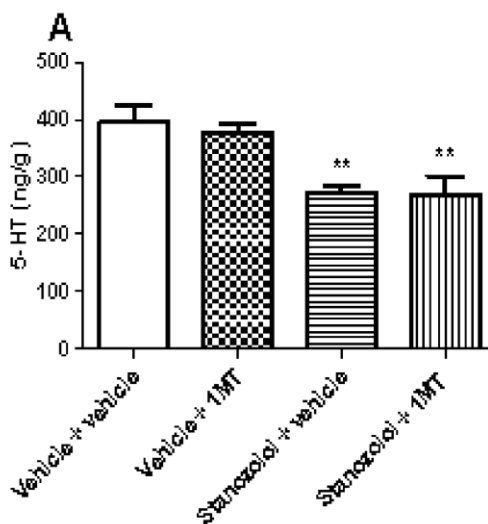


Figura 3B – Níveis de ácido 5-HIAA no hipocampo. \*\*Comparação dos grupos STA + Controle e STA + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.01$ .

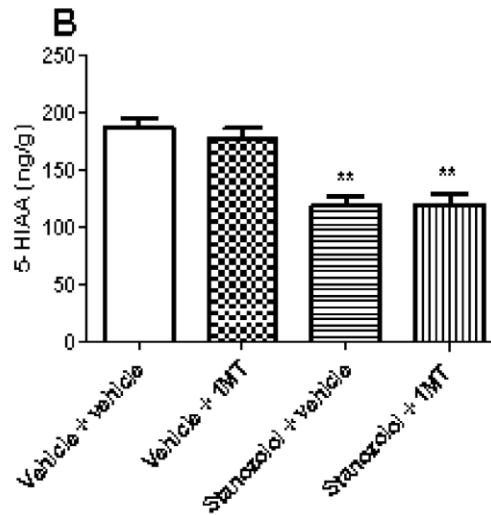


Figura 3C – Relação 5-HIAA / 5-HT no hipocampo.

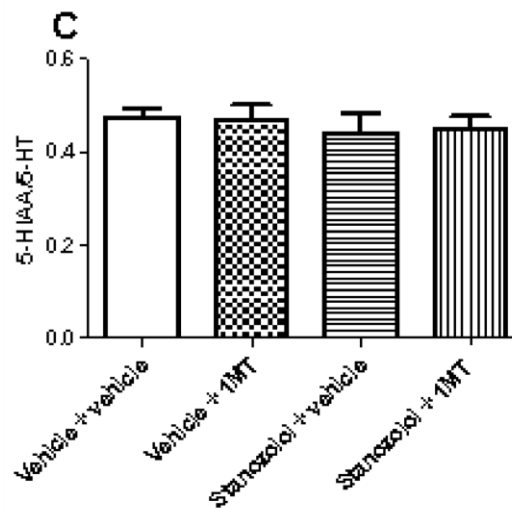


Figura 3D – Níveis de 5-HT no córtex pré-frontal. \*\*Comparação dos grupos STA + Controle e STA + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.01$ .

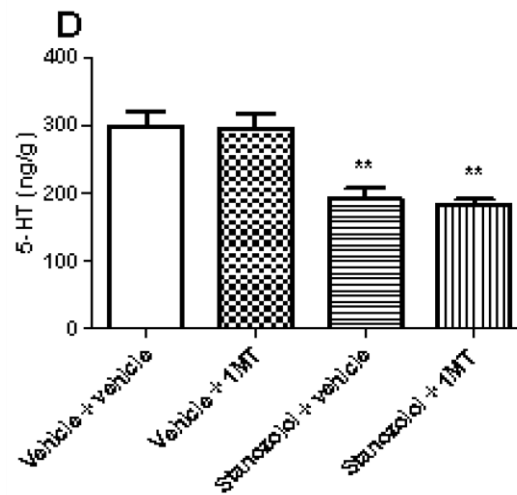


Figura 3E – Níveis de 5-HIAA no córtex pré-frontal. \*\*Comparação dos grupos STA + Controle e STA + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.01$ .

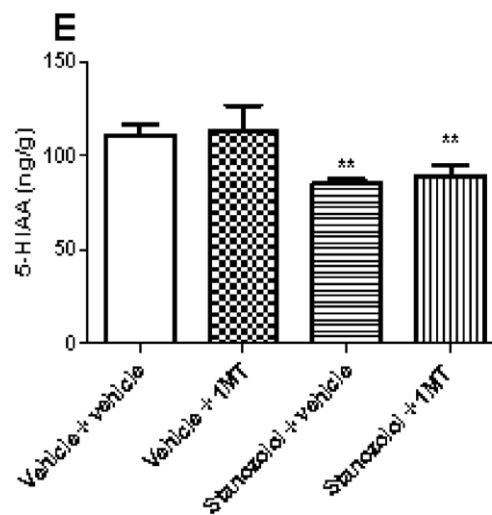
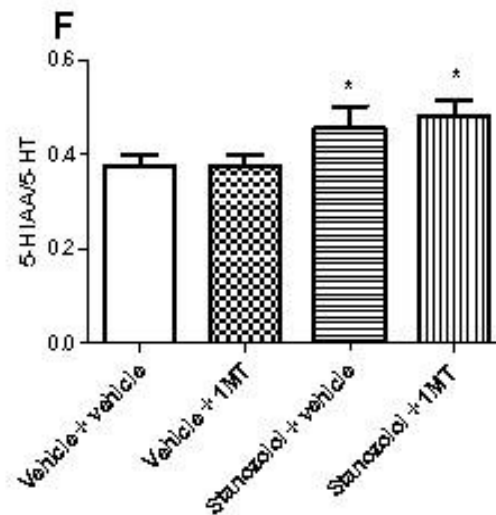


Figura 3F – Relação 5-HIAA / 5-HT no córtex pré-frontal. \*Comparação do grupo STA + 1MT e STA + Controle com Controle no  $p < 0.05$ .



Os resultados do teste de Newman-Keuls demonstraram que o grupo STA teve um aumento significativo nos níveis de TRP e QUIN no córtex pré-frontal e no em comparação com o grupo controle. O tratamento com 1-MT reverteu a elevação dos níveis de TRP e QUIN no hipocampo e no córtex pré-frontal resultante do tratamento com STA (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F).

Figura 4A – Níveis de triptofano no hipocampo. \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $< 0.05$ .

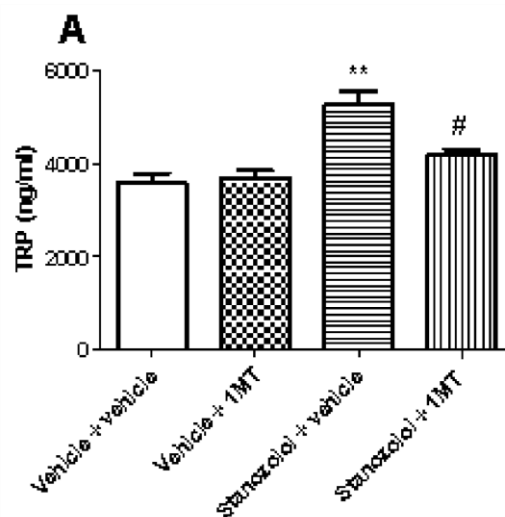


Figura 4B – Níveis de QUIN no hipocampo. \*\*Comparação dos grupos Controle + 1-MT e STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Veículo no  $p < 0.05$ .

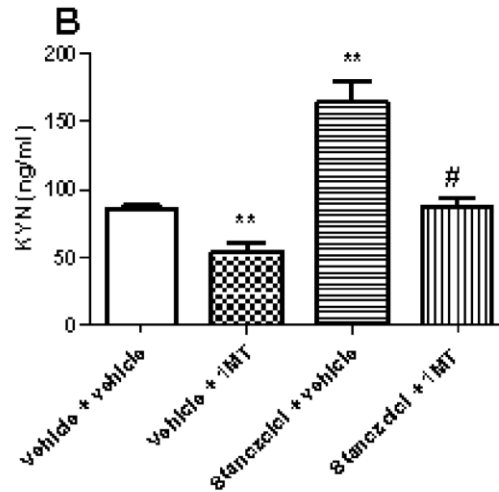


Figura 4C – Relação QUIN / TRP no hipocampo. \*\*Comparação dos grupos Controle + 1-MT e STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .

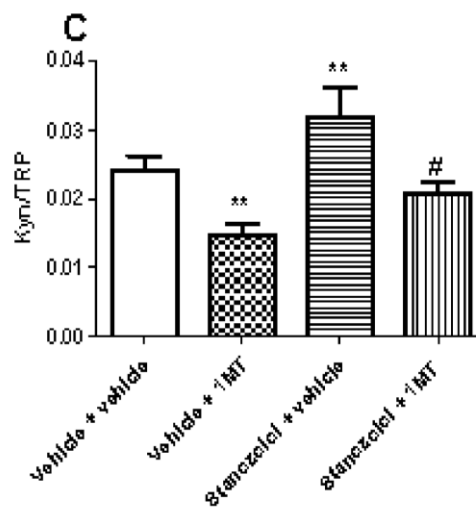




Figura 4D – Níveis de triptofano no córtex pré-frontal. \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .

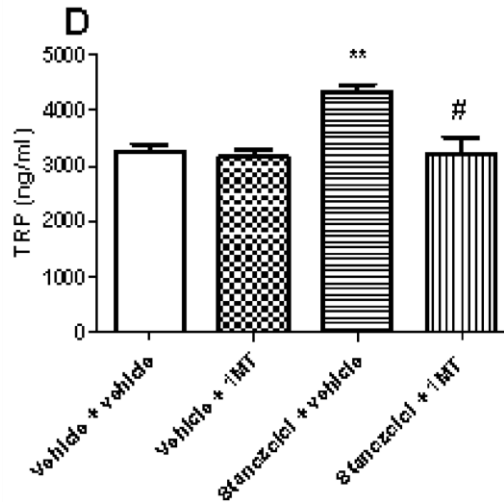


Figura 4E – Níveis de QUIN no córtex pré-frontal. \*\*Comparação dos grupos Controle + 1-MT e STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .

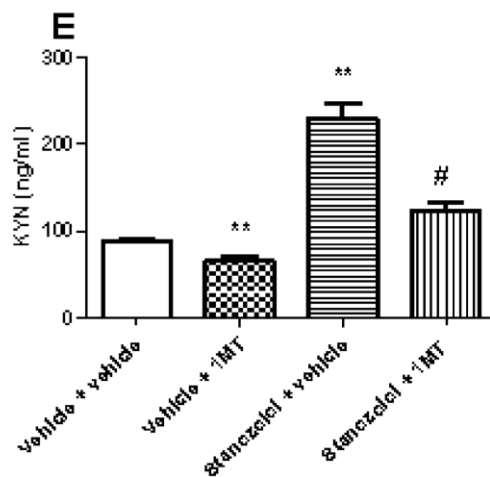
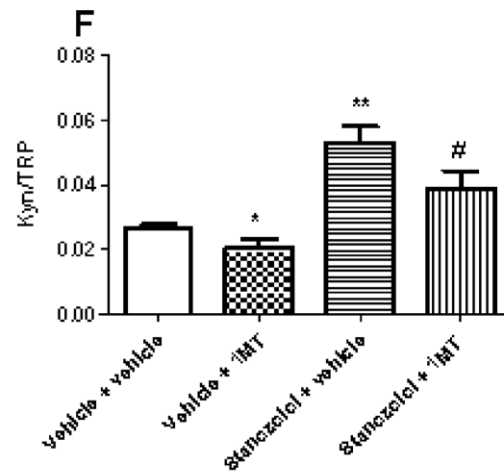


Figura 4F – Relação QUIN / TRP no córtex pré-frontal. \*Comparação do grupo Controle + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .



O teste post hoc mostrou que o grupo STA teve um aumento significativo na atividade de IDO no hipocampo e no córtex pré-frontal em comparação com o grupo controle. O tratamento com 1-MT (inibidor de IDO) atenuou o aumento da atividade IDO no hipocampo e no córtex pré-frontal resultante do tratamento com EST (Figuras 5A e 5B).

Figura 5A – Atividade de IDO no hipocampo. \*Comparação do grupo Controle + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .

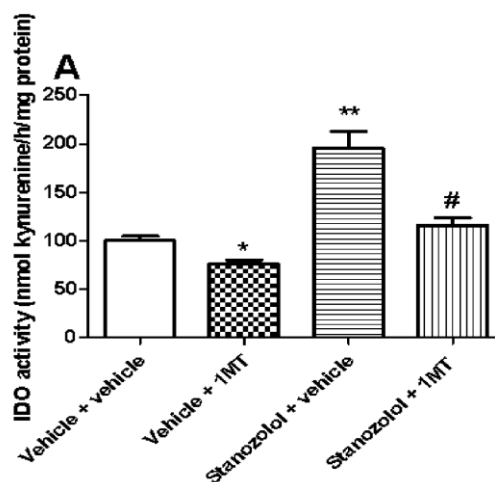
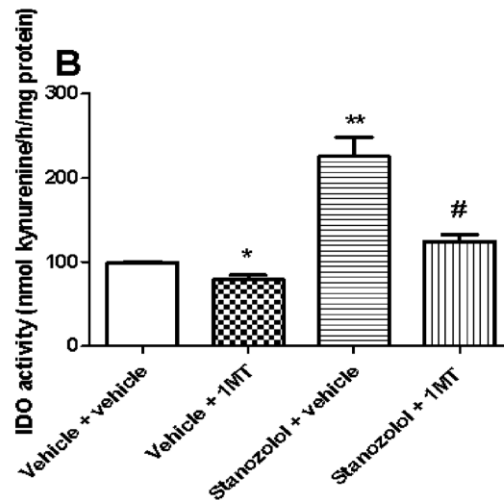


Figura 5B – Atividade de IDO no córtex pré-frontal. \*Comparação do grupo Controle + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com

Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .



A ANOVA bidirecional dos níveis de AQ no hipocampo e no córtex pré-frontal demonstrou uma significativa interação STA X 1mt ( $F_{1,16} = 10,13$ ;  $p < 0,01$ ) e um efeito significativo no grupo STA ( $F_{1,16} = 24,12$ ;  $p < 0,001$ ) e 1 -MT ( $F_{1,16} = 44,12$ ,  $p @ 0,01$ ). As comparações post hoc revelaram que a EST diminuiu significativamente os níveis de AQ no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos em comparação com o grupo de controlo. O tratamento com 1-MT impediu o aumento dos níveis de AQ causados por EST (Fig. 6A e 6B).

Figura 6A – Níveis de ácido quinólico no hipocampo. \*Comparação do grupo Controle + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .

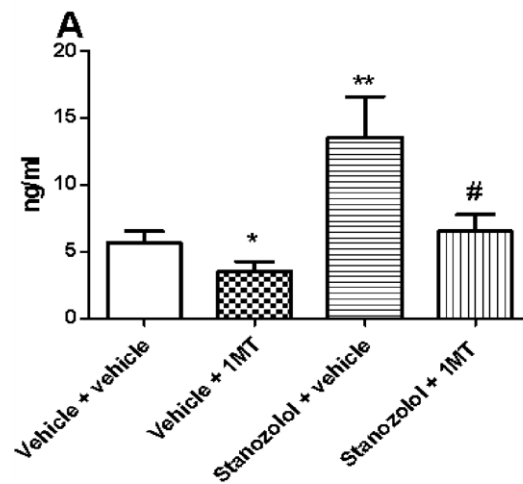
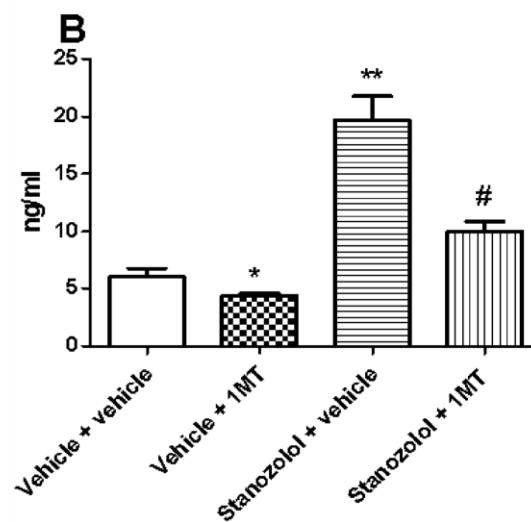
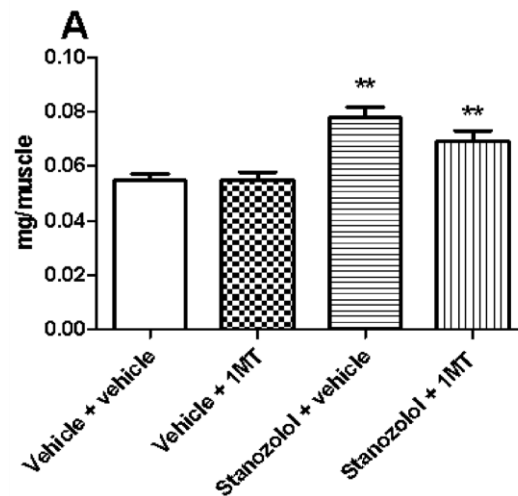


Figura 6B – Níveis de ácido quinólico no córtex pré-frontal. \*Comparação do grupo Controle + 1-MT com Controle + Controle no  $p < 0.05$ . \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . #Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Controle no  $p < 0.05$ .



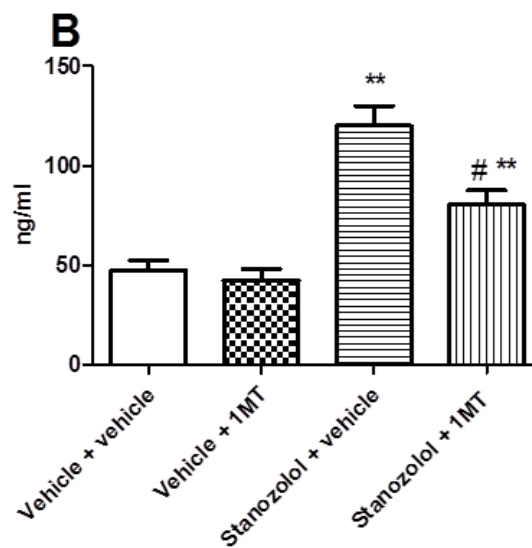
A análise estatística do peso do músculo gastrocnêmio revelou efeito significativo no grupo STA ( $F_{1,16} = 47,23$ ;  $p < 0,001$ ). As comparações post hoc demonstraram que o EST aumentou significativamente o peso do músculo gastrocnêmio dos camundongos em comparação com o grupo de controle. O tratamento com 1-MT não impediu o aumento do peso do músculo gastrocnêmio causado por EST (Fig. 7A).

Figura 7A – Peso do músculo gastrocnêmio. \*\*Comparação dos grupos STA + Controle e STA + 1-MT com o grupo Controle + Controle no  $p < 0.01$ .



Os níveis de corticosterona aumentaram no grupo STA quando comparados com o controle (veículo / veículo). No grupo 1-MT, o tratamento inverte este aumento no plasma (Fig. 7B).

Figura 7B – Níveis de corticosterona no sangue. \*\*Comparação do grupo STA + Controle com Controle + Controle no  $p < 0.01$ . \*\*\*Comparação do grupo STA + 1-MT com STA + Veículo e Veículo + Veículo no  $p < 0.05$ .



### 3. 4 Discussão

Os resultados obtidos neste estudo, revelaram que quando comparado ao grupo controle, o tratamento com EST aumentou a atividade de IDO e os níveis de TRP, QUIN, AQ no CPF e HIPP. Mas ainda, diminuiu os níveis de 5-HIAA, 5-HT. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por TUCCI, et al (2012), que relataram que ratos tratados com EST apresentaram mudanças comportamentais e bioquímicas, comprovando que o uso abusivo deste anabolizante afeta consideravelmente as monoaminas cerebrais em diferentes áreas do cérebro. Além disso, a injeção i.p de 1-MT demonstrou-se eficaz na prevenção de algumas destas alterações neuroquímicas, sendo capaz de restaurar no HIPP e CPF a atividade IDO, os níveis de QUIN, TRP e AQ, a relação QUIN / TRP, juntamente com a diminuição do número de ataques no teste do Intruso-residente.

O presente estudo demonstrou que os camundongos tratados com EST na dosagem de 50mg/ kg/ dia, apresentaram comportamento agressivo no teste Intruso-residente. Este modelo descreve efetivamente os mecanismos comportamentais de ação de várias drogas com ações agressivas e anti-agressivas (OLIVIER & YOUNG, 2002). O grupo STA + Controle mostrou um aumento no número de ataques e uma redução na latência dos ataques quando comparado ao grupo controle. Segundo LUMIA & MCGINNIS (2010) os índices de respostas agressivas dependem de vários fatores, como o contexto ambiental, o sexo do animal, a idade do animal residente e do intruso, a provocação física e o tipo de EAA administrado. Além disso, os estudos com camundongos machos tratados com EAA mostraram uma predisposição diferente para agressão quando testados em três ambientes diferentes (gaiola doméstica, gaiola oposta e gaiola neutra) (LUMIA et al., 1994; BREUER et al., 2001; FARRELL & MCGINNIS, 2003). Camundongos adultos machos tratados com doses suprafisiológicas de EAA são menos agressivos em gaiolas neutras ou opostas enquanto que em sua gaiola doméstica são mais agressivos em relação ao seu intruso (BREUER et al., 2001; FARRELL & MCGINNIS, 2003).

Com base nisso, sugerimos que o elevado número de ataques no grupo STA+ Controle está associado ao comportamento dominante em sua gaiola doméstica, já que os camundongos tendem a defender seu território. Presumimos que a baixa latência de ataques pode ser devido aos intrusos serem mais jovens que os residentes, por esta razão tendem a não oferecer resistência aos ataques dos residentes. Então, havendo uma submissão por parte do intruso, o combate não é continuado. Para excluir um possível efeito psicoestimulante da

administração de EST e 1-MT, empregou-se o teste em campo aberto para mostrar que a 1-MT não aumentou a atividade locomotora, demonstrando que o tratamento com EST e 1-MT não causou excitação ou sedação nos animais.

A enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase tem por função, catalisar o passo de limitação de velocidade na degradação do TRP na VQ, processando-o para produzir metabólitos neuroactivos tais como 5-HT e AQ que estão implicados no desenvolvimento de sintomas agressivos (SALAZAR et al., 2012; COCCARO et al., 2015). Neste experimento, foi demonstrado que o grupo STA + Controle teve um aumento na atividade de IDO, conseqüentemente aumentaram os níveis de QUIN e a razão QUIN / TRP, seguidos por aumento na concentração e disponibilidade de TRP no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos. Estes dados são controversos e vão contra a hipótese de que o aumento da atividade de IDO reduz a biodisponibilidade de TRP à síntese de 5-HT, como já descrito por SOUZA et al. (2016). No entanto, outros estudos clínicos relataram que a degradação do TRP leva a uma deficiência do sistema serotoninérgico que pode influenciar os sintomas cognitivos de doenças psiquiátricas (PORTER et al., 2000; 2003).

Para determinar o papel da IDO mediado as alterações comportamentais induzidas por EST, administrou-se o inibidor de IDO 1-MT (i.p.) utilizando um único volume de injeção de 10 ml / kg. Revelando que o bloqueio farmacológico da ativação de IDO com 1-MT, impediu o desenvolvimento de comportamento agressivo em camundongos tratados com EST. Ainda, demonstramos que o tratamento com 1-MT recuperou a atividade IDO, a relação QUIN / TRP e os níveis de QUIN e AQ no CPF e HIPP de camundongos tratados com EST. Um achado interessante do presente estudo foi que o tratamento com 1-MT não conseguiu prevenir as alterações de 5-HT associadas com EST em HIPP e CPF. Evidenciando que o comportamento agressivo está ligado à produção de QUIN e dos seus subsequentes metabólitos neurotóxicos, do que ao comprometimento da síntese de 5-HT.

Como visto anteriormente, a alta atividade de IDO aumenta a degradação de TRP na VQ, produzindo mais metabólitos tóxicos, tais como AQ. Segundo VANDRESEN-FILHO (2015) o AQ em altas concentrações pode ser tóxico para o sistema nervoso central (SNC). Os complexos mecanismos de ação do AQ envolvem eventos inflamatórios, geração de radicais livres e resposta microglial (FORREST et al., 2013). Durante a neuroinflamação o AQ é produzido e liberado pela infiltração de macrófagos e microglia ativa, aumentando o dano celular em condições patológicas. Níveis aumentados de AQ podem induzir a secreção da fator de necrose tumoral (TNF-a), esta substância desempenha um papel central no dano

neuronal por efeitos tais como estimulação de radicais livres e neurotoxicidade mediada por glutamato (KALONIA et al., 2012). A produção de citocinas pode afetar diretamente o sistema 5-HT (COUCH et al., 2013), a diminuição da função 5-HT pré-sináptica como mecanismo para mudanças comportamentais é consistente, incluindo evidências de que os estímulos proinflamatórios aumentam a expressão do transportador 5-HT, reduzindo a disponibilidade de 5-HT na sinapse (ZHU et al., 2010; JENNINGS et al., 2006). O conhecimento dos mecanismos que regulam o desenvolvimento do sistema 5-HT permanece limitado. Isto devido ao 5-HT ser alvo de muitos reguladores fisiológicos, incluindo esteroides (LESCH e WAIDER, 2012). Assim, as alterações de 5-HT em HIPP e CPF dos camundongos tratados com EST podem ser correspondentes a elevação atividade de IDO, aumentando a produção de AQ que pode induzir a secreção de citocinas. Em apoio desta hipótese, tem sido relatado que a secreção de citocinas pode desempenhar um papel importante na terminação da neurotransmissão serotoninérgica por captação de 5-HT em neurônios présinápticos (TSAO et al., 2006)

No presente estudo, os níveis de citocinas inflamatórias não foram mensurados, mas como já foi observado, a alta concentração de AQ é tóxica para o SNC, podendo induzir a secreção de TNF- $\alpha$  e a resposta microglial. Durante a inflamação, a micróglia ativa induz a produção de mais AQ, tornando este processo um ciclo de inflamação do SNC. Em contraste, a administração crônica de EST aumenta a atividade IDO, aumentando assim os níveis de AQ, indicando que este EAA em concentrações elevadas pode levar a neuroinflamação. Assim, sugerimos que as alterações neurocomportamentais induzidas pelo EST não estão envolvidas com uma degradação aguda do TRP, mas sim com um aumento da atividade enzimática do IDO e dos níveis de metabolitos tóxicos produzidos na VQ. Segundo TUCCI (2012), tem sido relatado que a administração crônica de EST é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona, indicando uma situação de estresse ou alterações metabólicas. Assim, acreditamos que este EAA causa alterações metabólicas que geram estresse ao organismo e isto é visto através do aumento da corticosterona.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente estudo, demonstraram que o Estanozolol possui efeito propulsor sobre a atividade de IDO e que esta atividade elevada coincide com o comprometimento do comportamento agressivo, indicando um possível papel chave desta enzima em perturbações comportamentais agressivas. Os resultados da injeção de 1-Metil-Triptofano (1mg / kg/ dia) indicam uma inibição da atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase, que restaurou as alterações neuroquímicas no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos, controlando o comportamento agressivo induzido pelo tratamento com Estanozolol (50mg / kg/ dia). Em contrapartida, o 1-Metil-Triptofano não foi efetivo quanto a regeneração dos níveis de ácido 5-hidroxi-indoleacético e serotonina, tampouco a relação 5-HIAA / 5-HT. Evidenciando que o comportamento agressivo não está associado a uma degradação aguda de triptofano com consequente redução de serotonina, mas sim que o aumento da atividade IDO induzida por este anabólico, resulta na produção elevada de ácido quinólico na via das quinureninas, provocando ciclos de inflamações no córtex pré-frontal e hipocampo, ocasionando na desregulação do sistema serotoninérgico.

Além disto, o número de atos agressivos foi reduzido no grupo STA + 1-MT quando comparado ao grupo STA + Veículo, indicando que o 1-Metil-Triptofano atenuou o comportamento agressivo nos camundongos tratados com Estanozolol. Em contrapartida, o grupo STA + Veículo, não demonstrou agressividade quanto a latência dos ataques, o que pode estar relacionado a predominância destes animais em suas gaiolas frente à um intruso. Contudo, o alto número de ataques mostra que este EAA pode provocar transtorno explosivo intermitente e aumento da violência. Portanto, é importante que futuras pesquisas realizem experimentos englobando os testes em diferentes tipos de gaiolas, para obter resultados mais concretos sobre o comportamento agressivo.

Desta forma, sugerimos que distúrbios comportamentais agressivos induzidos pelo EST são conduzidos pela desregulação da atividade IDO no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos elevando a produção de metabólitos tóxicos ao SNC. Logo, a via das quinureninas e processos neuroinflamatórios mostram-se alvos importantes de novas terapêuticas no comportamento agressivo.

## REFERÊNCIAS

BHASIN, S.; STORER, T. W.; BERMAN, N.; CALLEGARI, C.; CLEVINGER, B.; PHILLIPS, J.; BUNNEL, T. J.; TRICKER, R.; SHIRAZI, A.; CASABURI, R. The Effects of Supraphysiologic Doses of Testosterone on Muscle Size and Strength in Normal Men. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1-7, 1996.

BRAFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 7, n. 72, p. 54-248, 1976.

BREUER, M. E.; MCGINNIS, M. Y.; LUMIA, A. R.; PROSSIDENTE, B. P. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. **Horm. Behav.** v. 40, p. 409-418, 2001.

COCCARO, E. F.; FANNING, J. R.; PHAN, K. L.; LEE, R. Serotonin and impulsive aggression. **CNS Spectr.** v. 20, n. 3, p. 295-302, 2015.

COCCARO, E. F.; LEE, R.; COUSSONS-READ, M. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokines and Aggression in Personality Disordered Subjects. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** v. 3, n. 7, p 1-7, 2015.

COMAI, S.; BERTAZZO, A.; BACHON, J.; DAIGLE, M.; TOUPIN, J.; CÔTÉ, G.; TURECKI, G.; GOBBI, G. Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers for aggression. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 70, p. 8-16, 2016.

CORNAGGIA, C. M.; BEGHI, M.; PAVONE, F.; BARALE, F. Aggression in psychiatry wards: A systematic review. **Psychiatry Research**, v. 189, p. 10-20, 2011.

CORNAI, S.; CAVALLETTO, L.; CHEMELLO, L.; BERNARDINELLO, E.; RAGAZZI, E.; COSTA, C. V.; BERTAZZO, A. Effects of PEG-interferon alpha plus ribavirin on tryptophan metabolism in patients with chronic hepatitis C. **Pharmacol. Res.** v. 63, p. 85-92, 2011.

COUCH, Y.; MARTIN, C. J.; HOWARTH, C.; RALEY, J.; KHRAPITCHEV, A. A.; STRATFORD, M.; SHARP, T.; SIBSON, N. R.; ANTHONY, D. C. Systemic inflammation alters central 5-HT function as determined by pharmacological MRI. **NeuroImage**, v. 75, p. 177-186, 2013.

DEFENSOR, E. B.; CORLEY, M. J.; BLACHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiol Behav.** v. 107, n. 5, p. 5-680, 2012.

EATON, D.; KANN, L.; KINCHEN, S.; SHAKLIN, S.; FLINT, K.; HAWKINS, J.; HARRIS, W.; LOWRY, R.; MCMANUS, T.; CHYEN, D.; WHITTLE, L.; LIM, C.; WECHESLER, H. Youth risk behavior surveillance – United States. **Morb. Mortal. Wkly Rep.** v. 61, p. 1-162, 2011.

FARRELL, S. F.; MCGINNIS, M. Y. Effects of pubertal anabolic-androgenic steroid (AAS) administration on reproductive and aggressive behaviors in male rats. **Behav. Neurosci.** v. 117, p. 904-911, 2003.

FILHO, C. B.; JESSE, C. R.; DONATO, F.; DEL FABBRO, L.; DE COMES, M. G.; GOES, A. T.; SOUZA, L. C.; GIACOMELI, R.; ANTUNES, M.; LUCHESE, C.; ROMAN, S.S.; BOEIRA, S. P. Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. **Eur J Pharmacol.** v. 15, n. 791, p. 284-296, 2016.

FORREST, C. M.; KHALIL, O. S.; MCNAIR, K.; SNITCOFSKY, M.; GONZALEZ, N.; JERUSALINSKY, D.; DARLINGTON, L. G.; STONE, T. W. Changes in synaptic transmission and protein expression in the brains of adult offspring after prenatal inhibition of the kynurenine pathway. **Neuroscience.** v. 59, p. 241-254, 2013.

HARMER, P. A. Anabolic-androgenic steroid use among young male and female athletes: is the game to blame? **Br. J. Sports Med.** V. 44, p. 26-31, 2010.

JENNINGS, K. A.; LODER, M. K.; SHEWARD, W. J.; PEI, Q.; DEACON, R. M.; BENSON, M. A.; OLVERMAN, H. J.; HASTIE, N. D.; HARMAR, A. J.; SHEN, S.; SHARP, T. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. **J. Neurosci.** v. 26, n. 35, p. 8955-8964, 2006.

KALONIA, H.; MISHRA, J.; KUMAR, A. Targeting neuro-inflammatory cytokines and oxidative stress by minocycline attenuates quinolinic-acid-induced Huntington's diseaselike symptoms in rats, **Neurotox. Res.** v. 22, n. 4, p. 310-320, 2012.

KALININE, E.; ZIMMER, E. R.; ZENKI, K. C.; KALININE, I.; KAZLAUCKAS, V.; HAAS, C. B.; HANSEL, G.; ZIMMER, A. R.; SOUZA, D. O.; MÜLLER, A. P.; PORTELA, L. V. Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. **Hormones and Behavior**, v. 66, p. 383-392, 2014.

KERSEY, R. D.; ELLIOT, D. L.; GOLDBERG, L.; KANAYAMA, G.; LEONE, J. E.; PAVLOVICH, M.; HARRISON, G. P. J. National Athletic Trainers' Association Position Statement: Anabolic-Androgenic Steroids. **Journal of Athletic Training**, v. 47, n. 5, p.567588, 2012.

KOTERMANSKI, S. E.; JOHNSON, JON. W.; THIELS, E. Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 109, p. 67–76, 2013.

LE GREVES, P.; SHARMA, H. S.; WESTMAN, J.; ALM, P.; NYBERG, F. Acute heat stress induces edema and nitric oxide synthase upregulation and down-regulates mRNA levels of the NMDAR1 and NMDAR2B subunits in the rat hippocampus. **Acta Neurochirurgica**, v. 70, p. 275-278, 1997.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, p. 175-191, 2012.

LUMIA, A. R.; MCGINNIS, M. Y. Impact of anabolic androgenic steroids on adolescent males. **Physiol. Behav.** v. 100, p. 199-204, 2010.

LUMIA, A. R.; THORNER, K. M.; MCGINNIS, M. Y. Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. **Physiol. Behav.** v. 55, p. 331-335, 1994.

MAINI, A. A.; MAXWELL-SCOTT, H.; MARKS, D. J. Severe alkalosis and hypokalemia with stanozolol misuse. **The American Journal of Emergency Medicine. Estados Unidos.** v. 32, n. 2, p. 4-194, 2014.

MELLONI, R. H.; RICCI, L. A. Adolescent exposure to anabolic/androgenic steroids and the neurobiology of offensive aggression: a hypothalamic neural model based on findings in pubertal Syrian hamsters. **Horm. Behav.** v. 58, p. 177-191, 2009.

NELSON, R. J.; TRAINOR, B. C. Neural mechanisms of aggression. **Nat Rev Neurosci.** v. 8, n. 7, p. 46-536, 2007.

OLIVIER, B.; YOUNG, L. J. Animal models of aggression. **Neuropsychopharmacology**, p. 1699-1708, 2002.

PORTER, R. J.; LUNN, B. S.; O'BRIEN, J. T. Effects of acute tryptophan depletion on cognitive function in Alzheimer's disease and in the healthy elderly. **Psychol. Med.** v. 33, p. 41-49, 2003.

PORTER, R. J.; LUNN, B. S.; WALKER, L. L.; GRAY, J. M.; BALLARD, C. G.; O'BRIEN, J. T. Cognitive deficit induced by acute tryptophan depletion in patients with Alzheimer's disease. **Am. J. Psychiatry**, v. 157, p. 638-640, 2000.

PIEROZAN, P.; BIASIBETTI, H.; SCHMITZ, F.; ÁVILA, H.; PARISI, M. M.; BARBETUANA, F.; WYSE, A. T. S.; PESSOA-PUREUR, R. Quinolinic acid neurotoxicity: Differential roles of astrocytes and microglia via FGF-2-mediated signaling in redox-linked cytoskeletal changes. **Biochimica et. Biophysica Acta**, v. 1863, n. 12, p. 3001-3014, 2016. ROBINSON, S.; PENATTI, C. A. A.; CLARK, A. S. The role of the androgen receptor in anabolic androgenic steroid-induced aggressive behavior in C57BL/6J and Tfm mice. **Hormones and Behavior**, v. 61, p. 67-75, 2012.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.** v. 28, p. 3-33, 2003.

SALAZAR, A.; GONZALEZ-RIVERA, B. L.; REDUS, L.; PARROTT, J. M.; O'CONNOR, J. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. **Horm Behav**, v. 62, n. 3, p. 202-209, 2012.

SANTO, F. Z. E. ESTANOZOLOL: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **UDESC.** p. 8-48, 2007.

SCHWARCZ, R.; BRUNO, J. P.; MUCHOWSKI, P. J.; WU, H. Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 13, p. 465-477, 2012.

SEO, D.; PATRICK, C. J. Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. **Aggress Violent Behav**, v. 13, n. 5, p. 383-395, 2008.

SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003

SOUZA, L. C.; JESSE, C. R.; ANTUNES, M. S.; RUFF, J. R.; DE OLIVEIRA ESPINOSA, D.; GOMES, N. S.; DONATO, F.; GIACOMELI, R.; BOEIRA, S. P. Indoleamine-2,3-dioxygenase mediates neurobehavioral alterations induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- $\beta$ 1-42 peptide in mice. **Brain Behav Immun**. v. 56, p. 77-363, 2016.

TAKASHI, A.; QUADROS, I. M.; ALMEIDA, R. M.; MICZEK, K. A. Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. **Psychopharmacology**, v. 213, p. 183-212, 2011.

THIBLIN, I.; PARLKLO, T. Anabolic androgenic steroids and violence, **Acta Psychiatr Scand**, v. 103, p. 125-128, 2002.

TSAO, C. W.; LIN, Y. S.; CHEN, C. C.; BAI, C. H.; WU, S. R. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30, p. 899-905, 2006.

TUCCI, P.; MORGESE, M. G.; COLAIANNA, M.; SCHIAVONE, S.; CUOMO, V.; TRABACE, L. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. **Steroids**, v. 77, p. 269-275, 2012.

VANDRESEN-FILHO, S.; SEVERINO, P. C.; CONSTANTINO, L. C.; MARTINS, W. C.; MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BERTOLDO, D. B.; SILVAR, F. R. M. B.; TASCA, C. I. *N*-Methyl-d-aspartate Preconditioning Prevents Quinolinic Acid-Induced Deregulation of Glutamate and Calcium Homeostasis in Mice Hippocampus. **Neurotox. Res**. v. 27, n. 2, p. 118-128, 2015.

VAN DER VEGT, B. J.; LIEUWES, N.; VAN DE WALL, E. H.; KATO, K.; MOYAALBIOL, L.; MARTÍNEZ-SANCHIS, S.; DE BOER, S.; SIETSE, F.; KOOLHAAS, J. M.; Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. **Behav. Neurosci.** v. 117, p. 667-674, 2003.

YANG, M.; WEBER, M. D.; CRAWLEY, J. Light Phase Testing of Social Behaviors: Not a Problem. **Front Neurosci.** v. 2, n. 2, p. 186-191, 2008.

ZHU, C. B.; LINDLER, K. M.; OWENS, A. M.; DAWS, L. C.; BLAKELY, R. D.; HEWLETT, W. A.; Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2510-2520, 2010.

ZWILING, D.; HUANG, S.Y.; SATHYASAIKUMAR, K. V.; NOTARANGELO, F. M.; GUIDETTI, P.; WU, H. Q.; LEE, J.; TRUONG, J.; ZWILING, Y. A.; HSIEH, E. W.; LOUIE, J. Y.; WU, T.; SCEARCE-LEVIE, K.; PATRICK, C.; ADAME, A.; GIORGINI, F.; MOUSSAOUI, S.; LAUE, G.; RASSOULPOUR, A.; FLIK, G.; HUANG, Y.; MUCHOWSKI, J. M.; MASLIAH, E.; SCHWARZ, R.; MUCHOWSKI, P. J. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. **Cell.** v. 145, n. 6, p. 863-874, 2011.

WONODI, I.; SCHWARCZ, R. Cortical kynurenine pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. **Schizophr. Bull.** V. 36, p. 211-218, 2010.

