

# Quantidade de Células de Purkinje no Cerebelo de Camundongos Sob o Uso de Esteróides Anabolizantes

*Quantity of Mice Cerebellum Purkinje Cells under Anabolic Steroids Use*

*Dauanda Kecia Silva<sup>1</sup>, Alessandra Esteves<sup>2</sup>, Wagner Costa Rossi Júnior<sup>3</sup>, Denismar Alves Nogueira<sup>4</sup>*

## RESUMO

**Objetivo.** Verificar possíveis alterações quantitativas de corpos de neurônios, no córtex cerebelar, causadas pelo uso de esteróides anabolizantes. **Método.** Doze camundongos foram tratados com anabolizantes uma vez por semana e submetidos à natação três vezes na semana, tendo o tratamento a duração total de um mês. Após o sacrifício dos animais os cerebelos foram retirados, fixados, processados histologicamente. Os cortes foram tirados com 5µm de espessura corados com violeta cresil modificada e analisados por um microscópio acoplado a uma câmera e um software de análise para contagem dos corpos de neurônios. **Resultados.** Os resultados obtidos revelaram que não houve diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparados os grupos tratados. Para os grupos Potenay (4,92) e Deca-Durabolin (5,14) os valores médios de corpos de neurônios de Purkinje foram iguais ao do grupo controle (4,92). **Conclusão.** Pode-se observar que não houve variações na densidade de corpos de neurônios no córtex cerebelar dos camundongos submetidos ao tratamento com esteróides anabolizantes comparados ao grupo controle.

**Unitermos.** Neurônios, Esteróide, Natação, Camundongos, Cerebelo.

**Citação.** Silva DK, Esteves A, Rossi Júnior WC, Nogueira DA. Quantidade de Células de Purkinje no Cerebelo de Camundongos Sob o Uso de Esteróides Anabolizantes.

## ABSTRACT

**Objective.** For this reason, the purpose of this study was to investigate quantitative changes in the neurons bodies of Purkinje caused by the use of anabolic steroids. **Method.** Twelve mice were used and received treatment with steroids (group 1- Deca Durabolin; group 2- Potenay; group 3- Saline) once a week and submitted to swimming three times a week, taking total treatment duration one month. After the sacrifice of animals, the cerebellum were removed, fixed and histological processed. Sections with 5 µm were realized in the cerebellum and modified cresyl violet was used for staining. The slices were analyzed by light microscope and software to count the neurons bodies. **Results.** The results revealed that the source of variation was not statistically significant ( $P < 0.05$ ) when compared with treated groups. For Potenay group (4.925) and Deca-Durabolin group (5.14) the average values of Purkinje neuron bodies were equivalent of the control group (4.9275). **Conclusion.** These data show that there was no variation in density of neurons bodies in cerebellum cortex in mice treated with anabolic steroids compared with control group.

**Keywords.** Neurons, Steroid, Swimming, Mice, Cerebellum.

**Citation.** Silva DK, Esteves A, Rossi Júnior WC, Nogueira DA. Quantity of Mice Cerebellum Purkinje Cells under Anabolic Steroids Use.

**Trabalho realizado no Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, Brasil.**

1. Biomédica graduada pela UNIFAL/MG, Alfenas-MG, Brasil.
2. Médica Veterinária Doutora, Docente da disciplina de Anatomia nos cursos de Biomedicina e Nutrição da Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.
3. Cirurgião dentista Doutor, Docente da disciplina de Anatomia para o curso de Enfermagem e Escultura dental no curso de Odontologia da Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.
4. Zootecnista Doutor, Docente da disciplina de Estatística para o curso de Odontologia e Química da Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil.

## Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Alessandra Esteves  
Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Anatomia.  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro  
CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil.  
Fone: +35 3299 1302  
E-mail: aesteves@unifal-mg.edu.br

Original

Recebido em: 25/05/11

Aceito em: 04/10/11

Conflito de interesses: não

## INTRODUÇÃO

Os hormônios esteróides são produzidos pelo córtex da supra-renal e pelas gônadas (ovário e testículo). Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólico-androgênicos (EAA) são os hormônios esteróides da classe dos hormônios sexuais masculinos, promotores e mantenedores das características sexuais associadas à masculinidade (incluindo o trato genital, as características sexuais secundárias e a fertilidade) e do *status* anabólico dos tecidos somáticos. Os esteróides anabólicos compreendem a testosterona e seus derivados. Entretanto, alguns autores referem os esteróides anabolizantes como os derivados sintéticos da testosterona que possuem atividade anabólica superior à atividade androgênica (masculinização)<sup>1</sup>.

No mercado, existem disponíveis vários tipos de EAA que desencadeiam de forma indissociável efeitos anabólicos e androgênicos<sup>2</sup>.

Em 1954, na Áustria foi onde ocorreu o primeiro relato da utilização de EAA com objetivos não terapêuticos. Desde então estas substâncias vêm despertando a atenção de profissionais da área da saúde e pesquisadores devido à sua grande utilização por atletas profissionais e amadores, com o objetivo de aumentar a massa muscular, melhorar o desempenho físico e a estética corporal<sup>2</sup>.

O abuso de EAA, dentro e fora do ambiente esportivo, se constitui atualmente em grande preocupação social, governamental e das mais importantes agências sanitárias e esportivas como a OMS e o Comitê Olímpico Internacional. Várias estimativas de prevalência destas substâncias vêm sendo apresentadas em diferentes segmentos da sociedade e da prática desportiva, com resultados bastante variáveis, estando mais disponíveis na literatura Norte-Americana<sup>3</sup>.

A partir de 1976, na Olimpíada de Montreal, onde foi realizado pela primeira vez o controle de anabolizantes, devido a razões de ordem ética e aos efeitos nocivos à saúde, essas substâncias tiveram o uso proibido pelo COI. Seis atletas foram punidos pelo uso indevido<sup>4</sup>.

O cerebelo tem sido tradicionalmente visto como uma parte do sistema nervoso central motor responsável pela iniciação e regulação dos movimentos padrões, recebendo estímulos primariamente do córtex motor, órgãos vestibulares e dos receptores proprioceptivos<sup>5</sup>.

O cerebelo tem como principais funções o contro-

le do equilíbrio e coordenação motora do corpo animal. Devido a esta importância determinamos então esta linha de pesquisa com o cerebelo e os neurônios de Purkinje e sua morfologia, para que possamos inferir dados que possam ser importantes para a continuação de pesquisas que envolvam o sistema nervoso central ou a neurociência<sup>6</sup>.

À coordenação de atividades de postura, locomoção e de equilíbrio estão localizados no lobo floculonodular, o lobo caudal diz respeito à regulação por retroalimentação da função motora enquanto que o lobo rostral recebe impulso da informação proprioceptiva. A camada de células de Purkinje é formada por uma única fileira dessas células, que são muito grandes, e possuem dendritos que se subdividem profusamente num mesmo plano, formando uma espécie de leque<sup>7</sup>.

## MÉTODO

### Amostra

Foram utilizados 12 camundongos do Biotério Central da Unifal-MG e de acordo com os princípios éticos de utilização animal da Comissão de Ética da Unifal-MG, protocolo nº 224/2009.

### Procedimento

Os camundongos foram divididos em três grupos, contendo cada um 4 animais, da seguinte maneira:

Grupo 1: Animais submetidos a solução fisiológica 10mg/kg/dia

Grupo 2: Animais submetidos ao anabolizante Potenay® Sulfato de mefentermina 0,5mg para cada 100gr de peso vivo/dia

Grupo 3: Animais submetidos ao anabolizante Decadurabolin® Decanoato de Nandrolona 0,5mg para cada 100gr de peso vivo/dia

Os animais após receberem as doses, foram submetidos à natação por 30 minutos, realizado em um recipiente com água corrente e após o exercício foram pesados a fim de conferir o aumento de massa corpórea/dia por 30 dias<sup>8</sup>.

Após o sacrifício dos animais, foram coletados seus encéfalos totalizando no final 12 encéfalos. Os camundongos foram identificados quanto à idade e peso.

Após a identificação do animal iniciamos então o seguinte procedimento: Os encéfalos permaneceram

imersos na solução tampão fosfato pH 7,4 (Paraformaldehyde – Sigma Chemical Co. USA) fixadora por três semanas então, o cérebro e o cerebelo foram separados. Em cada cerebelo definimos os diferentes sítios escolhidos para estudo nos dois hemisférios cerebelares. Foram retiradas amostras homotípicas destes locais.

As amostras foram preparadas a fim de se obter a melhor imagem dos neurônios de Purkinje na microscopia de luz com processamento em parafina. A coloração utilizada foi o método de violeta cresil modificada e a análise das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico LMB-2, acoplado a uma câmera de vídeo e monitor de computador<sup>9</sup>.

Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em Histosec<sup>®</sup> (Merck)<sup>10,11</sup>.

O cerebelo foi emblocado e cortado com espessura de 5µm em um micrótomo Lupe modelo MRP09. Foram feitos cortes nos blocos em diferentes posições a fim de se extinguir a possibilidade de visualização de cortes tangenciais ou oblíquos causando assim um resultado falso ao trabalho. De cada cerebelo foram feitos cinco cortes desprezando 5 cortes entre estes. Os cortes foram corados pelo método de coloração de violeta cresil modificada para facilitar a visualização dos neurônios de Purkinje e assim possibilitar sua contagem<sup>9</sup>.

Foram realizadas análises descritivas do número médio de corpos de neurônios de Purkinje, visando estabelecer o padrão característico de cada um dos animais, bem como foi efetuada a verificação das pressuposições comumente utilizadas em análises de dados experimentais. As análises descritivas foram realizadas por meio de procedimento PROC MEANS do programa Statistical Analysis Systems.

Para avaliação dos números médios de corpos de neurônios de purkinje, segundo as diferenças de tratamentos (grupos estudados) utilizou-se a análise de variância. Como não foi verificado o efeito significativo ( $P < 0,05$ ) na análise de variância entre os grupos comparativos para as diferentes variáveis estudadas, utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk para discriminar as diferenças e/ou igualdades entre as médias avaliadas.

## RESULTADOS

Observa-se que a fonte de variação não foi significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparados os grupos tratados.

As estimativas de médias dos corpos de neurônios em cada grupo estudado encontram-se na Tabela 1. Para o grupo 1 a média de corpos de neurônios foi de 4,92 e dos animais do grupo 2 foi de 5,14, valores iguais aos observados para o grupo controle (4,92) pelo teste Shapiro-Wilk. Estes valores mostram que não houve uma diminuição na densidade média de corpos de neurônios de Purkinje dos animais submetidos ao tratamento de EAA.

Tabela 1

*Estimativas de médias das densidades de corpos de neurônios no córtex cerebelar dentro de cada grupo avaliado*

Tratamentos	Médias	Resultados*
Potenay <sup>®</sup>	4,92	a
Deca Durabolin <sup>®</sup>	5,14	a
Controle	4,92	a

Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Shapiro-Wilk ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Até o presente momento, poucos foram os estudos da relação do uso de anabolizantes esteróides e diminuição no número de corpos de neurônios de Purkinje. A grande maioria de trabalhos publicados está associada aos graves efeitos colaterais psicogênicos que altas doses de anabólicos esteróides incluindo comportamento agressivo e violento e dependência química que tais substâncias provocam. Em usuários de tais substâncias também são comuns os transtornos psiquiátricos<sup>12-14</sup>. Estes resultados obtidos por tais autores nos mostra que não há relação dos problemas comportamentais e dos transtornos psíquicos com a diminuição do número de corpos de neurônios de Purkinje cerebelares, visto que o cerebelo é um órgão responsável pelas funções de equilíbrio e motricidade do organismo.

Estudos realizados em ratos Wistar que foram submetidos a ingestão crônica de álcool, foi observado uma diminuição significativa de células de Purkinje assim como de células granulares do cerebelo. Provavelmente a

ocorrência de toxicidade é devido ao fato da entrada do etanol no sistema nervoso ser livre, ou seja, não há limite para a passagem do álcool pela barreira hematoencefálica devido à sua alta lipossolubilidade e alto coeficiente de partição óleo-água<sup>15</sup>. Como os EAA tem menor lipossolubilidade em relação ao etanol, não houve toxicidade no cerebelo pelo uso dessas substâncias.

O uso de anabolizantes esteróides aumenta as chances de morte neuronal em regiões corticais no cérebro de camundongos<sup>16</sup>. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que anabolizantes esteróides não levam há uma diminuição significativa no número de corpos de neurônios no cerebelo de camundongos, podendo este tipo de anabolizante não ter atração por neurônios de Purkinje.

## CONCLUSÃO

Portanto, os resultados obtidos permitem observar a não ocorrência de decréscimo na densidade de corpos de neurônios no córtex cerebelar dos camundongos submetidos ao tratamento com esteróides anabolizantes em relação ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS

- 1.Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides Anabolizantes no Esporte. Rev Bras Med Esporte 2002;8(6):235-43.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922002000600005>
- 2.Cunha TS. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. Arq Bras End Metab 2006;50(3):532-40.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000300017>

- 3.Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre, RS. Arq Bras End Metab 2007;51:104-10.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302007000100017>
- 4.Marques MAS, Pereira HMG, Neto FRA. Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. Rev Bras Med Esporte 2003;9:15-24.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922003000100004>
- 5.Sens PM. Participação do cerebelo no processamento auditivo. Revista brasileira de Otorrinolaringologia 2007;73(2):266-70.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992007000200019>
- 6.Banks WJ. Tecido nervoso. In: Banks WJ. Histologia veterinária básica. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991, p.339-40.
- 7.Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Tratado de anatomia veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.222.
- 8.Vieira RP. Estudo do decanoato de nandrolona sobre o fígado de ratos Wistar. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2003, p.28.
- 9.Esteves A, Prada ILS, Carvalho, AF. Comparação do número de corpos neuronais de áreas do córtex cerebral de cães. Braz J Vet Res Ani Sci 2008;45(3):231-8.
- 10.Ruela C, Lima-Matos L, Sobrinho-Simões MA, Paula-Barbosa MM. Comparative morphometric study of cerebellar neurons. Acta Anat 1980;106:270-5.  
<http://dx.doi.org/10.1159/000145190>
- 11.Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003, p.34-41.
- 12.Corrigan B. Anabolic steroids and the mind. Med J Aust 1996;165:222-6.
- 13.Grimes JM. Plasticity in anterior hypothalamic vasopressin correlates with aggression during anabolic-androgenic steroid withdrawal in hamsters. Behav Neurosci 2006;120:115-24.  
<http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.115>
- 14.Cunningham RL. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. Neuroscience 2007;150(3):609-15.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.038>
- 15.Apfel MIR, Ésberard CA, Rodrigues FKP, Júnior FMB, Sillero R. Estudo estereológico das células de purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos wistar. Arq Neuropsiquiatr 2002;60:232-5.
- 16.Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Motolese M, Matrisciano F, Togna G, et al. Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. Brain Res 2007;24:21-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.047>