



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF) UFSCAR/UNESP**



**“EFEITOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO À COCAÍNA E TESTOSTERONA EM RATOS
ADOLESCENTES E ADULTOS”**

SHEILA ANTONAGI ENGI

SÃO CARLOS – SP

2012



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF) UFSCAR/UNESP**



**“EFEITOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO À COCAÍNA E TESTOSTERONA EM RATOS
ADOLESCENTES E ADULTOS”**

SHEILA ANTONAGI ENGI

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

E57ep

Engi, Sheila Antonagi.

Efeitos periféricos e centrais decorrentes da exposição à cocaína e testosterona em ratos adolescentes e adultos / Sheila Antonagi Engi. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisiologia. 2. Cocaína. 3. Testosterona. 4. Sensibilização central. 5. Efeitos periféricos. 6. Ratos. I. Título.

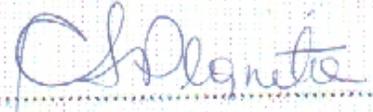
CDD: 612 (20^a)

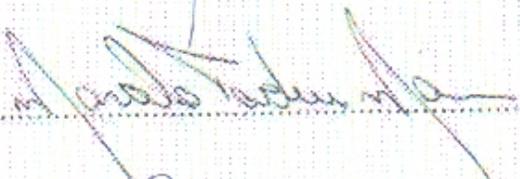
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

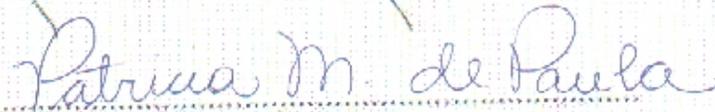
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Sheila Antonagi Engi

Dia 11/09/2012

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta..... 

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin..... 

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula..... 

"Há duas fontes perenes de alegria pura: o bem realizado e o dever cumprido."

Eduardo Girão

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, pelo amor, carinho, dedicação, esforço e confiança em mim.

*“A jornada pareceu árdua e difícil.
O desânimo tentou se apossar por vezes.
Entretanto, o lembrar de sua face preocupada,
E tanto envelhecida no correr destes anos,
De seu trabalho, de suas orações, de seu apoio incondicional para me dar o melhor,
Me impulsionou deveras para a luta.
Obrigada, muito obrigada pelo silêncio,
Quando eu reclamava e,
obrigada também pelas suas palavras de estímulo quando eu me calava.
Nessa grande batalha, creia que a vitória também é sua!”*

Mãe, não importa a distância, pois quem ama sempre está perto no coração.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof^a Dr^a Cleopatra da Silva Planeta, que me deu a oportunidade de conhecer parte do universo da neurociência, e conviver diariamente com pessoas magníficas. Com toda certeza, esse conjunto fez com que nesses anos eu me transformasse em um ser humano melhor.

Para mim, você é um exemplo de profissionalismo e competência.

A você, deixo a singela mensagem:

“Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres.

Aos primeiros respeita-se; aos segundos escuta-se; aos últimos segue-se.”

Também gostaria de agradecer meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos César Crestani, que me introduziu no “mundo cardiovascular” e com quem tenho aprendido muito.

Obrigada pelo suporte e pela disposição em sempre ajudar!

Aos meus amigos de laboratório **Ana Cláudia, Cindy, Cleidiane, Diego, Josiane, Karina, Kelciane, Ludimila, Matheus, Paula, Paulo, Rodrigo, Taísa, Tarciso e Tatiani, e todos os outros**, pela convivência diária. Também agradeço às minhas duas amigas **Vivian Maria Zeraik e Natalia Perussi Biscola** – mesmo longe, vocês estão sempre comigo em pensamento. Todos vocês fazem parte da minha história:

“Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila.

Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.

A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos.

Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo.

Deles não quero resposta, quero meu avesso.

Que me tragam dúvidas e angústias e aguentem o que há de pior em mim.

Para isso, só sendo louco.

Quero os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças.

Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta.

Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria.

Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto.

Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.

Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos.

Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça.

Não quero amigos adultos nem chatos.

Quero-os metade infância e outra metade velhice!

Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos, para que nunca tenham pressa.

Tenho amigos para saber quem eu sou.

Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei

de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril.” (OSCAR WILDE)

À Tatiani Sorregotti por ter se tornado mais que uma amiga, uma companheira de “gordices” e uma irmã!

À Karina Santos Gomes e Paula Bianchi pelos conselhos e boa amizade.

À Fabio Cardoso Cruz por ter me ensinado tanto e pela amizade incondicional. Muito do que sei hoje, devo a você. Mesmo longe, sinto-se sempre abraçado e querido por mim.

À Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva, carinhosamente chamadas de Bete e Rô. Muito do meu trabalho realizado eu devo a vocês, por terem me ajudado tanto ao longo desse período. Muito obrigada!

À Tirene, que além de ser uma profissional exemplar, é minha amiga nas horas vagas.

Ao Prof. Dr. Ricardo L. Nunes de Souza pelos ensinamentos e amizade.

Aos Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP Araraquara e, Prof^a Dr^a Regina Célia Vendramini do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara por terem me auxiliado nas análises de alguns parâmetros utilizados nesse estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa por ter cedido seu laboratório na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para o desenvolvimento de parte dos experimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara.

Ao Laboratório de Farmacologia pela estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade.

Aos sujeitos utilizados nessa pesquisa, meu respeito e agradecimento.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

Drug abuse is considered a major public health problem in the world. The use of cocaine and anabolic-androgenic steroids (AAS) has increased in Brazil. Epidemiological studies indicate that adolescents are more vulnerable than adults to progress from the occasional use of drugs to dependence and that teenagers have a higher incidence of cocaine and testosterone abuse. There is evidence that testosterone can modify the acute effects of cocaine and increase dopaminergic transmission that could lead to behavioral cross-sensitization. Studies have shown that the use of cocaine or ASS promotes toxicity to the heart and liver. Thus, the purpose of the present study was to investigate: 1) whether the prior administration of AAS could cause cross-sensitization with cocaine and thereby increase the vulnerability to abuse and dependence to this psychostimulant, 2) the cardiovascular effects resulted from chronic use of these substances combined and 3) the toxic effects resulted from chronic use of these substances combined. In this way, our results showed that chronic administration of testosterone caused cross-sensitization to cocaine in adolescent, but not in adult rats. And that the combined chronic administration of testosterone and cocaine caused increased MAP, SAP and DAP in adult, but not in adolescent rats. Furthermore, our results showed that the chronic testosterone and cocaine administration caused no damages to liver cellules but caused severe damages to heart tissue in adolescent and adult rats.

RESUMO

O abuso de drogas é considerado um grande problema de saúde pública no mundo. O uso de cocaína e esteróides androgênicos anabólicos (EAA) também tem aumentado no Brasil. Estudos epidemiológicos indicam que adolescentes são mais vulneráveis que adultos para passar do uso ocasional de cocaína para a dependência e que adolescentes apresentam maior incidência de uso de cocaína e testosterona. Existem evidências de que a testosterona pode modificar os efeitos agudos da cocaína e aumentar a transmissão dopaminérgica, o que poderia causar sensibilização cruzada entre testosterona e cocaína. Estudos demonstram que o uso de cocaína ou EAA promove toxicidade cardíaca e hepática. Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo investigar: 1) se a administração prévia de AAS poderia causar sensibilização cruzada com cocaína e dessa forma aumentar a vulnerabilidade ao abuso e dependência a esse psicoestimulante; 2) efeitos cardiovasculares decorrentes do uso combinado dessas substâncias e 3) os efeitos tóxicos decorrentes do uso combinado crônico dessas substâncias. Assim, nossos resultados demonstraram que a administração crônica de testosterona causou sensibilização cruzada à cocaína em ratos adolescentes, mas esse mesmo fenômeno não foi observado em ratos adultos. A administração crônica de testosterona e cocaína também causou aumento da PAM, PAS e PAD em ratos adultos, mas não em ratos adolescentes. Além disso, também foi observada que a administração crônica de testosterona e cocaína não causou danos às células hepáticas, mas sim sérios danos nos tecidos cardíacos de ratos adolescentes e adultos.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	
1.1) ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2) ABUSO E DEPENDENCIA DE SUBSTANCIAS PSICOATIVAS..	2
1.3) EFEITOS TOXICOS DO USO DE COCAÍNA E ESTERÓIDES ANDROGÊNICOS ANABÓLICOS.....	7
2) OBJETIVOS.....	
2.1) OBJETIVOS GERAIS.....	10
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	
3.1) PARECER ÉTICO.....	11
3.2) ANIMAIS.....	11
3.3) FÁRMACOS.....	11
3.4) AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	12
3.5) AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR.....	12
3.6) COLETA DE SANGUE.....	13
3.7) ANALISE DE CORTES HISTOLOGICOS.....	14
3.8) ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	16
4) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	
4.1) LOCOMOÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE COCAÍNA EM RATOS ADOLESCENTES E ADULTOS PRÉ-TRATADOS COM ADMINISTRAÇÃO AGUDA OU REPETIDA DE TESTOSTERONA	18
4.2) AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS DO USO REPETIDO COMBINADO DE TESTOSTERONA E COCAÍNA	19

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	
5.1) MÉTODOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	20
6) RESULTADOS.....	
6.1) AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	21
6.2) AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR.....	26
6.3) ANÁLISE DE CORTES HISTOLÓGICOS.....	30
6.4) ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	46
7) DISCUSSÃO.....	
7.1) DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	54
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
8.1) RELAÇÃO DE AUTORES CONSULTADOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigamos em ratos adultos e adolescentes:

- 1) o efeito da administração aguda ou repetida de testosterona no aumento da atividade locomotora induzida pela cocaína;
- 2) os efeitos da administração repetida de testosterona e cocaína na função cardiovascular de ratos adultos e adolescentes;
- 3) alterações histológicas no coração e fígado após a administração combinada de testosterona e cocaína.
- 4) alterações de parâmetros bioquímicos enzimáticos: creatina quinase B (CK-MB) para análise de danos cardíacos; alanina aminotransferase (ALT); aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina para análise de danos hepáticos, após a administração combinada de testosterona e cocaína.

1.1 Aspectos Gerais

O abuso de drogas tem alcançado proporções consideráveis nos últimos anos e atualmente é considerado um problema de saúde pública mundial. Dados do UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC, 2010) indicam que em 2009 o número total de pessoas que utilizaram cocaína no mundo alcançou a marca dos 20,8 milhões, que corresponde 0,3% - 0,5% da população entre 15-64 anos. Levantamentos realizados pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2005) e pelo Grupo Interdisciplinar de Álcool e Drogas (GREAA, 2006) também mostram aumento no consumo de drogas ilícitas no Brasil. Segundo os dados do CEBRID (2005), 2,9% da população já fez uso de cocaína pelo menos uma vez na vida.

Assim como o uso de cocaína, o uso de esteroides androgênicos anabólicos (EAAs) também tem aumentado no mundo em decorrência de seu efeito anabólico, responsável pelo ganho de massa muscular (DAWSON, 2001; POPE *et. al.* 2009). Dessa maneira, um estudo recente demonstrou que 9,3% dos homens adultos que abusavam de cocaína também eram usuários de esteroides anabolizantes e muitos relataram ter iniciado o uso de cocaína como uma forma de atenuar efeitos negativos dos EAAs, como insônia, depressão e irritabilidade (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2004). No Brasil, o aumento do uso de EAA como droga de abuso é recente. Segundo dados do CEBRID (2005), 0,9% da população fez uso de algum EAA pelo menos uma vez na vida.

Entre os adolescentes, cocaína é a droga mais frequentemente usada em associação com os EAAs – 42% dos usuários usam essas duas

substâncias concomitantemente (DURANT *et. al.*, 1993). De 2002 a 2008 o abuso de cocaína e esteroides manteve-se constante na faixa de idade entre 12 e 20 anos (DEWIT *et. al.*, 1997).

1.2 Abuso e Dependência de Substâncias Psicoativas

A dependência a substâncias psicoativas é caracterizada como um fenômeno comportamental complexo com causas e consequências decorrentes de vários fatores que incluem desde mecanismos moleculares até aspectos sociais. A décima edição da classificação internacional de doenças (CID 10) define síndrome de dependência como um conjunto de fenômenos fisiológicos, comportamentais e cognitivos no qual o uso de uma substância adquire prioridade na vida do indivíduo. Além disso, define-se como característica central da dependência o desejo forte ou irresistível de consumir a substância psicoativa (WHO, 2002).

Em 1987, em um amplo artigo de revisão, WISE e BOZARTH propuseram que todas as substâncias psicoativas que induzem dependência são reforçadores positivos, ou seja, manifestam a sensação subjetiva de prazer por atuarem em regiões específicas do sistema de recompensa. Esses autores propuseram ainda que o efeito reforçador positivo das drogas é decorrente da ativação de um substrato neurobiológico comum - o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Os principais componentes do circuito do reforço são a área tegmental ventral (ATV) e suas projeções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo acúmbens, a amígdala e o córtex frontal e límbico. Os estados afetivos de prazer proporcionados pelas substâncias psicoativas podem explicar a experimentação e o uso ocasional. Entretanto, não explicam

a principal característica que define a farmacodependência, ou seja, a perda do controle do uso da droga e seu uso a despeito das consequências adversas (O'BRIEN, 2001; WHO, 2002).

Robinson e Berridge (1993) propuseram que o uso compulsivo das substâncias psicoativas de abuso resultaria de processos neuroadaptativos no sistema mesocorticolímbico promovidos pelo seu uso repetido e podem se expressar como sensibilização comportamental. Segundo a teoria da sensibilização do incentivo, o sistema dopaminérgico mesolímbico além de mediar a sensação subjetiva de prazer também regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos salientes. Dessa maneira, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados a ela tornam-se progressivamente mais atrativos desenvolvendo dessa forma um desejo obsessivo ("fissura") pela droga que é capaz de controlar o comportamento. Portanto, o desenvolvimento do desejo obsessivo pela droga resulta da sensibilização de vias dopaminérgicas mesolímbicas envolvidas com o incentivo motivacional e de recompensa (ROBINSON e BERRIDGE, 1993).

Em modelos animais a sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento progressivo da atividade locomotora após a administração repetida da substância psicoativa de abuso (ROBINSON e BECKER, 1986). E esse aumento da atividade locomotora observado na sensibilização comportamental decorre de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico homólogas àquelas responsáveis pela transição do uso controlado para o uso compulsivo das substâncias psicoativas, como já relatado posteriormente (CONVIGTON e MICZEK, 2001; NESTLER *et. al.*, 2001; ROBINSON e BERRIDGE, 2001).

Muitos fatores podem aumentar a vulnerabilidade do desenvolvimento da dependência à cocaína, como por exemplo, o estágio de desenvolvimento. Neste sentido, estudos epidemiológicos indicam que adolescentes são mais susceptíveis para passar do uso abusivo de cocaína para a dependência (CHEN e KANDEL, 1995; REBOUSSIN e ANTHONY, 2006). Além disso, foi demonstrado que o uso prévio ou concomitante de outras substâncias pode aumentar a vulnerabilidade ao abuso e dependência de drogas. Por exemplo, a dependência à cocaína desenvolve-se mais facilmente em fumantes de tabaco que em não fumantes (HENNINGFIELD *et. al.*, 1990; LINDSAY e RAINEY, 1997). Outros estudos mostram que consumo simultâneo de cocaína e testosterona é crescente entre adolescentes (DURANT *et. al.*, 1993), e esta associação parece ocorrer para atenuar os efeitos negativos dos EAAs (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2004).

A administração repetida de uma determinada substância de abuso pode aumentar a resposta locomotora à administração subsequente de outra substância psicoativa, este fenômeno é chamado de sensibilização cruzada (CUNNINGHAM e KELLEY, 1992). Por exemplo, Collins e Izenwasser (2004) demonstraram que ratos adolescentes e adultos que foram pré-tratados com nicotina apresentaram sensibilização à cocaína. Da mesma forma, Santos *et. al.* (2009) mostraram que a administração repetida de anfetamina a ratos adolescentes induz a sensibilização cruzada entre esse psicoestimulante e nicotina. Considerando a teoria da sensibilização do incentivo, esses resultados sugerem que a exposição prévia a uma substância pode aumentar a vulnerabilidade à dependência de outra substância.

Alguns estudos pré-clínicos investigaram os efeitos da interação entre testosterona e cocaína após a administração aguda. Por exemplo, Minerly *et. al.* (2010) mostraram que ratos adolescentes (dia pós-natal 30) que receberam uma injeção de testosterona (5 ou 10 mg/kg) e após 45 minutos receberam injeção aguda de cocaína (20 mg/kg) apresentaram aumento na resposta locomotora induzida pela cocaína quando comparados aos animais que não foram pré-tratados com este hormônio. Da mesma forma, Martínez-Sanchis *et. al.* (2002) demonstraram que a administração aguda de testosterona resultou em um aumento na atividade locomotora induzida por cocaína em camundongos adolescentes. Esses dados sugerem que a administração de testosterona aumenta a sensibilidade à cocaína em animais adolescentes.

Apesar das evidências, poucos são os trabalhos que se dedicaram à investigação dos efeitos da administração repetida de testosterona na locomoção induzida pela cocaína. Dessa maneira, a demonstração de sensibilização cruzada entre testosterona e cocaína poderia ser sugestiva de que a exposição à EAAs pode influenciar a vulnerabilidade à dependência de cocaína.

Como já relatado, a sensibilização comportamental resulta de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (NESTLER *et. al.*, 2001). Neste sentido, estudos envolvendo microdiálise e análise de homogenato de tecido tem demonstrado que administrações repetidas de cocaína promovem sensibilização na liberação de dopamina no núcleo acúmbens (PONTIERE *et. al.*, 1995; PIERCE

e KALIVAS, 1997; RAHMAN *et. al.*, 2004; ROTHMAN e BAUMANN, 2006; LECCA *et. al.*, 2007; LOF *et. al.*, 2007).

Essa sensibilização da liberação de dopamina no núcleo acumbens promovida pela cocaína ocorre devido à ligação da cocaína com transportadores de membrana encontrados no terminal pré-sináptico dos neurônios encontrados na VTA (NESTLER, 2001). Dessa maneira, a ligação da cocaína com o transportador de membrana faz com que o transportador perca sua função de recaptar o excesso de dopamina da fenda sináptica e que uma maior quantidade desse neurotransmissor fique livre para ligar-se com seus receptores na membrana pós-sináptica dos neurônios encontrados no núcleo acumbens (NESTLER, 2001).

Após ser liberada na fenda sináptica a dopamina pode interagir com os receptores do subtipo D1, o que induz uma sequência de eventos intracelulares que incluem a estimulação da proteína G estimulatória (Gs), ativação da adenilil ciclase, aumento de AMPc com consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc - PKA (LU *et. al.*, 2006). Na sequência de eventos da transdução celular, a PKA ativada fosforila outras proteínas importantes na atividade intracelular (HEMMINGS *et. al.*, 1984), dentre elas o “cAMP response element binding protein” (CREB) que se liga a sítios específicos do DNA, levando ao aumento da taxa de transcrição dos genes de transcrição imediata (IEGs), como c-fos, c-jun e zif/268 (LU *et. al.*, 2006).

Em decorrência de sua interação com receptores extra e intracelulares e consequente modificação da transcrição gênica, a administração aguda de testosterona também seria capaz de promover liberação de dopamina no núcleo acumbens (QUIÑONES-JENAB *et al.*, 2001; TRIEMSTRA *et al.*, 2007).

Dessa maneira, alterações na neurotransmissão dopaminérgica no núcleo acúmbens poderiam estar envolvidas na interação dos efeitos da testosterona e cocaína. Assim, é interessante investigar se a administração repetida de EAA poderia promover neuroadaptações na via dopaminérgica, sensibilizando os efeitos da cocaína.

1.3 Efeitos Adversos do Uso de Cocaína e Esteroides Androgênicos Anabólicos

Muitos estudos têm demonstrado os riscos do uso prolongado dos EAAs (KANAYAMA *et. al.*, 2009). É importante notar que estas substâncias podem produzir muitos efeitos adversos, especialmente ao coração – como sugerido pelo crescente número de mortes por complicações cardíacas entre os usuários de EAAs, entre as idades de 20 a 30 anos (KANAYAMA *et. al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na toxicidade cardiovascular induzida por EAAs ainda não são totalmente entendidos. Contudo, o uso crônico de EAAs tem sido associado com hipertensão e patologias cardíacas (SULLIVAN *et. al.*, 1998; VAN AMSTERDAM *et. al.*, 2010). Os efeitos tóxicos dos EAAs ao tecido cardíaco resultam em cardiopatia caracterizada por danos na função sistólica e diastólica (D'ANDREA *et. al.*, 2007; KRIEG *et. al.*, 2007; WEINER *et. al.*, 2009). Além disso, o uso de EAAs parece aumentar as concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LENDERS *et. al.*, 1988; GLAZER *et. al.*, 1991) e diminuir as concentrações da lipoproteína de alta densidade (HDL), e essas alterações representam risco para o desenvolvimento de doenças coronárias (GRUNDY *et. al.*, 2004).

Assim como o uso indiscriminado de EAAs, o uso de cocaína é geralmente associado com efeitos ao coração (BENZAQUEN, *et. al.*, 2001; LANGE, *et. al.*, 2001). A administração aguda de cocaína provoca vários efeitos cardiovasculares, tais como hipertensão, vasoconstrição coronária e arritmias cardíacas (KLONER *et. al.*, 1992; MARAJ *et. al.*, 2010). Contudo, estudos propõem que as complicações cardiovasculares ocorram em decorrência do uso repetido de cocaína (ISNER *et. al.*, 1986; KLONER *et. al.*, 1992).

Apesar da alta prevalência do uso concomitante de EAA e cocaína, as informações a respeito dos efeitos cardiovasculares relacionados com o uso simultâneo dessas substâncias são limitadas. Mudanças na atividade do barorreflexo parecem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, falência cardíaca e infarto do miocárdio (DECK *et. al.*, 1992; GRASSI *et. al.*, 2006). Dessa maneira, Beutel *et. al.* (2005) demonstraram que o tratamento durante 8 semanas com estanozolol (um tipo de EAA) causou hipertensão em ratos adultos, que foram associadas a mudanças na atividade do barorreflexo. Além, Engi *et. al.* (2012) demonstraram que a administração repetida de testosterona e cocaína causou aumento significativo na pressão arterial média de ratos adultos, o que pode facilitar o desenvolvimento de hipertensão e conseqüente patologias associadas.

O uso de EAAs também pode causar hepatotoxicidade, que é caracterizada pela proliferação dos ductos biliares, peliose hepática, adenoma hepático e hepatocarcinoma (SANCHÉS-OSORIO *et. al.*, 2007; KANAYAMA *et. al.*, 2009).

Além disso, foi demonstrado que o uso de cocaína é hepatotóxico e altera a atividade enzimática do fígado. E esse efeito hepatotóxico provavelmente resulta de sua metabolização hepática pelo sistema microsômico P450, que promove a formação de um metabólito reativo capaz de formar' adutos com proteínas hepáticas provocando a morte dos hepatócitos (EVANS e HARBISON, 1978; NDIKUM-MOFFOR e ROBERTS, 2003).

Embora sejam claros os efeitos hepatotóxicos do uso individual de EAA e cocaína, poucos são os estudos a respeito dos efeitos crônicos do uso combinado dessas substâncias.

Dessa maneira, embora existam evidências dos efeitos tóxicos do uso agudo e crônico de EAA ou cocaína isoladamente, poucos estudos investigaram os efeitos periféricos do uso crônico combinado dessas substâncias em modelos experimentais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parecer Ético

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (CEP-15/2010) e os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - (COBEA).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adolescentes (dia pós-natal 28) e adultos (dia pós-natal 60) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Campus de Araraquara - UNESP no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 19 horas), com livre acesso a alimento e água.

Em ratos, a adolescência é definida como o período ao redor da maturação sexual, ocorrendo aproximadamente entre os dias pós-natal 28 e 42 (SPEAR *et. al.*, 2000).

3.3 Fármacos

- Testosterona 10 mg/kg (Pharma Nostra);
- Cloridrato de cocaína 10 mg/kg e 20 mg/kg (Merk®).

3.4 Avaliação da atividade locomotora

Foi utilizada a caixa de medida automática da atividade locomotora (Opto – Varimex, Columbus Instruments), medindo 45,1 x 8 x 44,1 cm (largura x altura x comprimento). Esta caixa possui 10 emissores de luz infravermelha, distantes 2,5 cm entre si e a 3,0 cm do piso da caixa. Cada unidade de locomoção corresponde à interrupção de um feixe de luz.



FIGURA 1 – Caixa de medida automática da atividade locomotora.

3.5 Avaliação da função cardiovascular

3.5.1 Canulação da artéria e veia femorais

Vinte e quatro horas antes dos experimentos os animais foram anestesiados com tribromo etanol na dose de 250 mg/kg i.p., para a implantação de um cateter na artéria e outro na veia femoral. Após implantação os cateteres foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a

cirurgia. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.). Os animais também receberam 2,5 mg/kg (s.c.) do analgésico não esteroide flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil).

3.5.2 Registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)

Vinte e quatro horas após a cirurgia, o cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments). Os valores de PAM e FC foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

Uma parte dos registros das funções cardiovasculares foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP com permissão do Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa e colaboração do Prof. Dr. Carlos César Crestani.

3.6 Coleta de sangue

Os animais foram decapitados e as amostras de sangue coletadas diretamente do tronco em tubos de ensaio heparinizados. Esses tubos foram então centrifugados por 15 minutos a 1245 G a 4° C.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos eppendorfs que foram armazenados em freezer -80° C para posterior utilização nos ensaios enzimáticos.

3.7 Análise de Cortes Histológicos

Após os animais terem sido decapitados, os órgãos coração e fígado foram removidos e mantidos em recipientes preenchidos com formol para conservação e fixação das peças.

Foram feitos cortes dos órgãos no sentido longitudinal e vertical para alocação nos cassetes, que permaneceram durante 24 horas em água corrente e depois em álcool. Os cassetes foram então preenchidos com parafina para a posterior realização dos cortes histológicos e montagem das lâminas, que foi seguida do protocolo de coloração de Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram mantidas na posição vertical, em estufa a 60°C por no mínimo 3 horas para que a parafina derretesse e escorresse, e em seguida foram retiradas para que resfriassem. As lâminas foram então acondicionadas em berços de coloração, que passam pelas seguintes etapas:

- 1- Banho em Xilol puro durante 3 minutos;
- 2- Banho em Xilol puro durante 3 minutos;
- 3- Banho em Álcool/Xilol (partes iguais) durante 3 minutos;
- 4- Banho em Álcool absoluto durante 3 minutos;
- 5- Banho em Álcool 90% durante 3 minutos;
- 6- Banho em Álcool 70% durante 3 minutos;
- 7- Banho em água destilada durante 3 minutos;

Depois dessa fase, as lâminas foram deixadas em repouso para que toda a água escorresse.

Em seguida, foi realizada a coloração com hematoxilina, que consistiu no preenchimento dos berços que continham as lâminas com o corante por no

mínimo 1 minuto. Posteriormente, foi feita a lavagem das lâminas em água corrente de maneira que o fluxo fosse controlado para não ocorrer o desprendimento dos cortes das lâminas.

Após o escoamento do excesso de água das lâminas foi realizada a coloração com eosina, que consistiu no preenchimento dos berços que continham as lâminas com o corante por no mínimo 30 segundos. Posteriormente, foi feita uma lavagem rápida com água, para a retirada de todo o corante do berço e as seguintes etapas foram seguidas:

1- Passagem por Álcool 95%;

2 - Banho em Álcool absoluto durante 3 minutos;

3 - Banho em Álcool absoluto durante 3 minutos;

4 - Banho em Álcool/Xilol (partes iguais) durante 3 minutos;

5 - Banho em Xilol puro durante 3 minutos;

6- Banho em Xilol puro durante 3 minutos. Nesse último banho, após os 3 minutos, as lâminas continuaram no banho de xilol enquanto foram sendo montadas com lamínula.

Para finalizar foi feita a montagem das lâminas com uma lamínula de vidro e cola (resina) tipo Permout ou Entelan.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em colaboração com o Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP Araraquara.

3.8 Ensaio Enzimáticos

3.8.1 Dosagem de Creatinina Quinase – MB (CK-MB)

Inicialmente 1,0 mL do reagente 1 (kit CK-MB LIQUIFORM - Labtest) foi transferido para um tubo ensaio, em seguida adicionou-se 0,05 mL de amostra do plasma coletado dos animais. A amostra e o reagente foram homogeneizados e incubados a 37° C durante 5 minutos. Após incubação a solução foi transferida para uma cubeta termostatizada a 37° C por 30 segundos. Após esse processo, foi feita a leitura da absorbância inicial (340 nm) e após 5 minutos foi realizada uma segunda leitura dessa absorbância para verificar a linearidade da reação.

3.8.2 Dosagem de Alanina Aminotransferase (ALT)

A reação iniciou-se com a adição de 0,1 mL de amostra do plasma dos animais a 1,0 mL do reagente (kit ALT/GPT LIQUIFORM – Labtest). Fez-se a homogeneização da amostra e do reagente, que foram transferidos para uma cubeta termostatizada a aproximadamente 37° C e esperou-se 1 minuto. Foi realizada então a leitura da absorbância inicial (de 340 nm) e repetiu-se sua leitura após 2 minutos para verificar a linearidade da reação.

3.8.3 Dosagem de Aspartato Transaminase (AST)

Primeiramente, acrescentou-se 0,1 mL de amostra do plasma coletado dos animais em 1,0 mL de reagente (kit AST/GOT LIQUIFORM – Labtest). Fez-se a homogeneização da amostra e do reagente que foram transferidos imediatamente para uma cubeta termostatizada a aproximadamente 37°C por 1 minuto. Após esse procedimento realizou-se a leitura da absorbância inicial

(340 nm) e repetiu-se a leitura após 2 minutos para verificar a linearidade da reação.

3.8.4 Dosagem de Fosfatase Alcalina

O procedimento começou com 1,0 mL do reagente de trabalho (kit FOSFATASE ALCALINA LIQUIFORM – Labtest) sendo pipetado em um tubo de ensaio, em seguida foi acrescentado 0,02 mL da amostra de plasma. A mistura foi homogeneizada e transferida imediatamente para uma cubeta termostaticada a aproximadamente 37° C. Esperou-se 1 minuto e realizou-se a leitura da absorbância inicial (em 405 nm), após 2 minutos a leitura da absorbância foi repetida.

As análises das enzimas foram feitas em colaboração com a Prof^ª. Dr^ª. Regina Célia Vendramini do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Locomoção induzida pela administração aguda de cocaína em ratos adolescentes e adultos pré-tratados com administração aguda ou repetida de testosterona.

Os animais adolescentes (DPN 28) e adultos (DPN 60) foram tratados um ou 10 dias consecutivos com testosterona (10 mg/kg) (N= 41 adultos; N=48 adolescentes) ou veículo (óleo de amêndoas) (N= 38 adultos; N=45 adolescentes) pela via subcutânea (s.c), e 3 dias após a última administração foram colocados na caixa para registro da atividade locomotora por 20 minutos para habituação. Em seguida, receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina 0,9% ou cocaína (10 mg/kg) e imediatamente foram colocados na caixa de atividade locomotora e a locomoção foi registrada por 40 minutos em intervalos de 5 e 5 minutos.

Assim, foram formados os seguintes grupos para administração aguda ou repetida de testosterona:

- Testosterona + cocaína
- Testosterona + salina
- Veículo + cocaína
- Veículo + salina

4.2 Avaliação dos efeitos adversos do uso repetido combinado de testosterona e cocaína

Os animais (N= 64) foram pré- tratados durante 10 dias consecutivos com testosterona (10 mg/kg; s.c.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.); testosterona (10 mg/kg, s.c.) e salina (i.p.); veículo (s.c.) e cocaína (i.p.) (20 mg/kg, i.p.); veículo (s.c.) e salina (i.p.). Vinte e quatro horas após a última administração todos os animais foram submetidos à cirurgia de canulação para implantação de cânulas na veia e artéria femorais (como descrito no item 3.5) e o experimento foi realizado vinte quatro horas após o procedimento cirúrgico.

No dia do experimento, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação e mantidos por 60 minutos, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. Cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa e foi realizado registro cardiovascular basal por um período mínimo de 30 minutos (como descrito no item 3.5.2).

Logo após o registro das funções cardiovasculares os ratos foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas diretamente do tronco para posterior ensaio enzimático (como descrito nos itens 3.6 e 3.8), também foram coletados os órgãos coração e fígado para posterior análise histológica (como descrito no item 3.7).

Assim, após o registro das atividades cardiovasculares a atividade das seguintes enzimas foi dosada: 1) isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB); 2) enzima alanina aminotransferase (ALT); 3) enzima aspartato transaminase (AST) e 4) enzima fosfatase alcalina.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando-se os fatores pré-tratamento (veículo x testosterona) e tratamento (salina X cocaína). Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram analisados pelo teste de Newman-Keuls.

Os dados das funções cardiovasculares foram analisados por ANOVA bifatorial, considerando os fatores tratamento (veículo – salina x veículo – cocaína x testosterona - salina x testosterona - cocaína) e idade (adultos x adolescentes). Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram analisados pelo teste de Bonferroni.

Os dados dos cortes histológicos foram analisados qualitativamente. As espessuras de ventrículo e átrio foram analisadas por ANOVA monofatorial, considerando-se o fator tratamento (veículo – salina x veículo – cocaína x testosterona - salina x testosterona - cocaína). Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram analisados pelo teste de Newman-Keuls.

Os dados bioquímicos foram analisados por ANOVA monofatorial, considerando-se o fator tratamento (veículo – salina x veículo – cocaína x testosterona - salina x testosterona - cocaína). Nos casos nos quais ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram analisados pelo teste de Newman-Keuls.

6. RESULTADOS

6.1. Locomoção induzida pela administração aguda de cocaína em ratos adultos e adolescentes pré-tratados com administração aguda de testosterona

A figura 2 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora induzida pela cocaína (10 mg/kg) em ratos adultos (A) (n=25) e adolescentes (B) (n=29) pré-tratados agudamente com testosterona (10 mg/kg) ou veículo (óleo de amêndoas) 45 minutos antes dos testes.

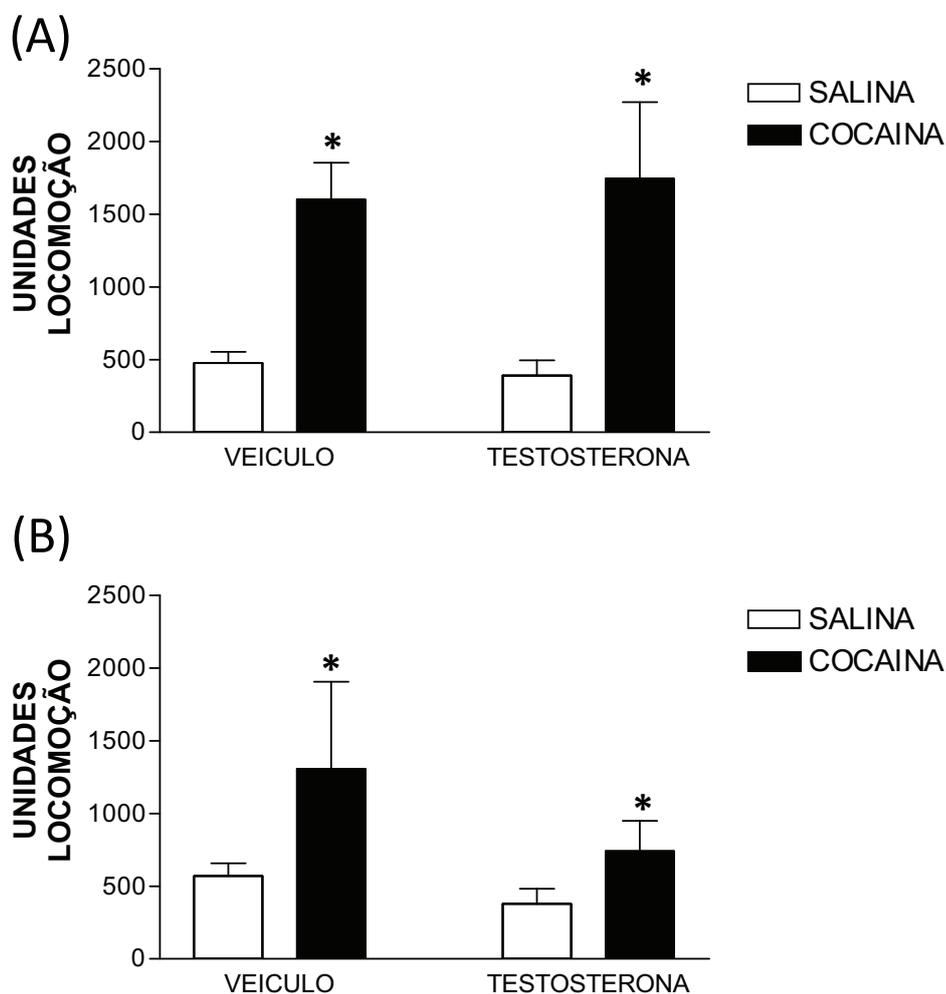


FIGURA 2 – Atividade locomotora de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) induzida pela administração de cocaína (10 mg/kg, i.p.) ou salina, administradas 45 minutos após a injeção aguda de testosterona (10 mg/kg, s.c.) ou veículo (óleo de amêndoas). Os dados representam a média ± EPM de 5-8 animais por grupo. * $p < 0,05$: comparados ao respectivo grupo controle.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na atividade locomotora considerando o fator pré-tratamento [$F_{(3,21)} = 0,008$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(3,21)} = 14,58$; $p < 0,05$]. Nenhuma interação foi observada entre os dois fatores [$F_{(3,21)} = 0,12$; $p > 0,05$] (FIGURA 2A).

Assim, a injeção aguda de cocaína aumentou a atividade locomotora independentemente do pré-tratamento.

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na atividade locomotora considerando o fator pré-tratamento [$F_{(3,25)} = 1,66$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(3,25)} = 5,22$; $p < 0,05$]. Nenhuma interação foi observada entre os dois fatores [$F_{(3,25)} = 0,30$; $p > 0,05$] (FIGURA 2B).

Assim, a injeção aguda de cocaína aumentou a atividade locomotora independentemente do pré-tratamento.

A figura 3 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora induzida pela cocaína (10 mg/kg) em ratos adultos (A) (n=26) e adolescentes (B) (n=31) pré-tratados agudamente com testosterona (10 mg/kg) ou veículo (óleo de amêndoas) 3 dias antes dos testes.

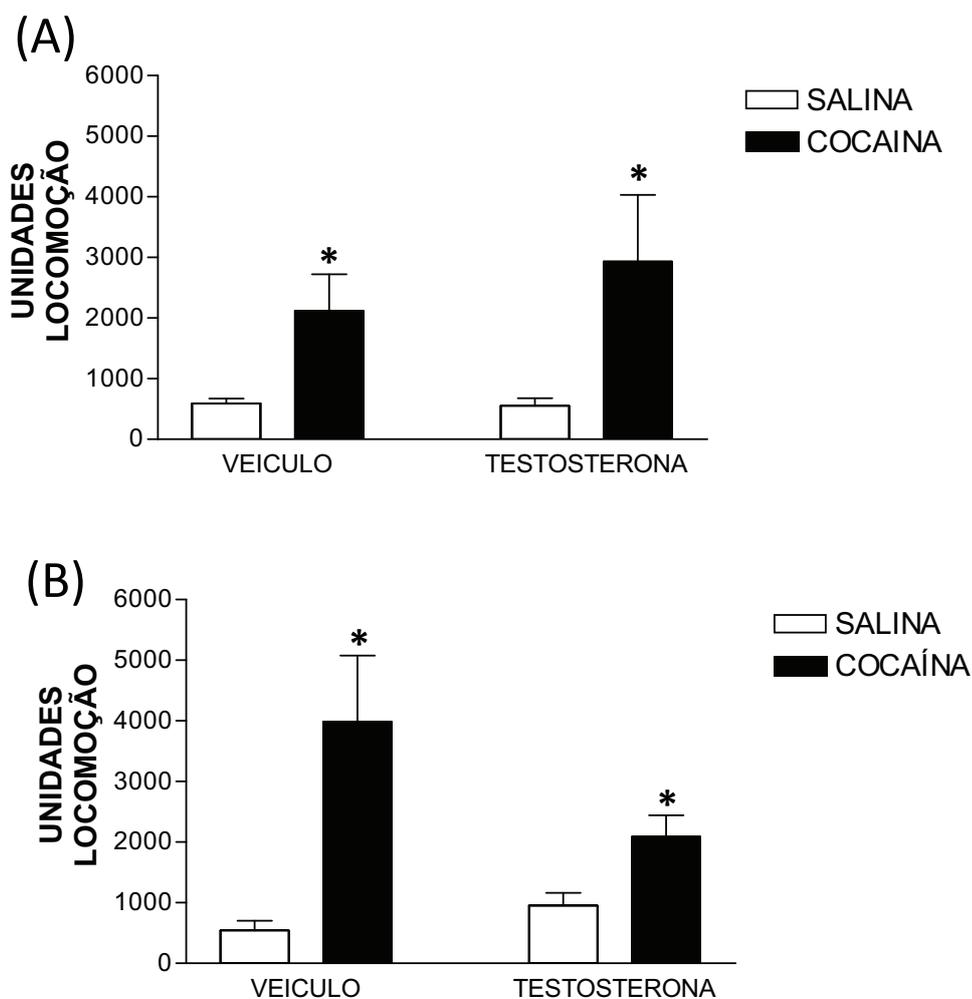


FIGURA 3 – Atividade locomotora de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) induzida pela administração de cocaína (10 mg/kg, i.p.) ou salina, administradas 3 dias após a injeção aguda de testosterona (10 mg/kg, s.c.) ou veículo (óleo de amêndoas). Os dados representam a média \pm EPM de 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$: comparados ao respectivo grupo controle.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na atividade locomotora considerando o fator pré-tratamento [$F_{(3,22)} = 0,31$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(3,22)} = 8,10$; $p < 0,05$]. Nenhuma interação foi observada entre os dois fatores [$F_{(3,22)} = 0,39$; $p > 0,05$] (FIGURA 3A).

Assim, a injeção aguda de cocaína aumentou a atividade locomotora independentemente do pré-tratamento.

Em ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na atividade locomotora considerando o fator pré-tratamento [$F_{(3,27)} = 1,49$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(3,27)} = 14,30$; $p < 0,05$]. Nenhuma interação foi observada entre os dois fatores [$F_{(3,27)} = 3,62$; $p > 0,05$]. (FIGURA 3B).

Assim, a injeção aguda de cocaína aumentou a atividade locomotora independentemente do pré-tratamento.

6.2. Locomoção induzida pela administração aguda de cocaína em ratos adultos e adolescentes pré-tratados com administração repetida de testosterona

A figura 4 mostra os resultados da avaliação da atividade locomotora induzida pela cocaína (10 mg/kg) em ratos adultos (A) (n=26) e adolescentes (B) (n=33) pré-tratados repetidamente durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg) ou veículo (óleo de amêndoas) e que receberam uma injeção de cocaína (10 mg/kg) ou salina após 3 dias.

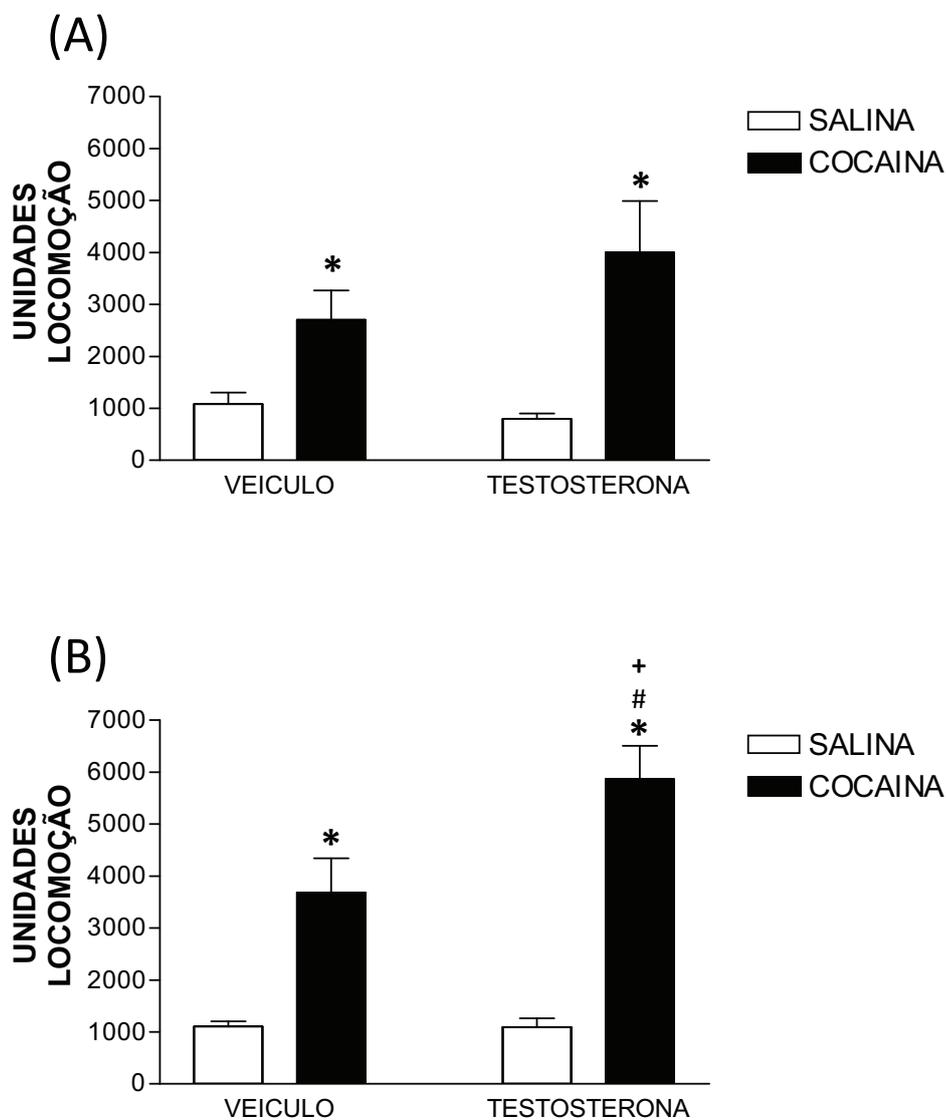


FIGURA 4 – Atividade locomotora de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) que receberam uma injeção de cocaína (10 mg/kg, i.p.) ou salina 3 dias após o término do tratamento repetido (10 dias) com testosterona (10 mg/kg, s.c.) ou veículo (óleo de amêndoas). Os dados representam a média \pm EPM de 6-9 animais por grupo. * $p < 0,05$: comparados aos respectivos controles. # $p < 0,05$: comparado ao grupo VEIC-SAL. + $p < 0,05$: comparado ao grupo VEIC-COC.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na atividade locomotora considerando o fator pré-tratamento [$F_{(3,22)} = 0,67$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(3,22)} = 15,46$; $p < 0,05$]. Nenhuma interação foi observada entre os dois fatores [$F_{(3,22)} = 1,65$; $p > 0,05$] (FIGURA 4A).

Assim, a injeção aguda de cocaína aumentou a atividade locomotora independentemente do pré-tratamento.

Nos ratos adolescentes, ANOVA revelou diferenças significativas na atividade locomotora considerando os fatores pré-tratamento [$F_{(3,29)} = 5,84$; $p < 0,05$] e tratamento [$F_{(3,29)} = 47,89$; $p < 0,05$]. Além disso, foi observada interação significativa entre os dois fatores [$F_{(3,29)} = 7,82$; $p < 0,05$] (FIGURA 4B).

O teste de Newman-Keuls revelou que o tratamento com cocaína aumentou a atividade locomotora em ambos os grupos veículo e testosterona, revelando o efeito estimulante dessa substância. Newman-Keuls revelou também que a atividade locomotora no grupo pré-tratado com testosterona foi maior quando comparado com o grupo pré-tratado com veículo, demonstrando assim a sensibilização cruzada entre testosterona e cocaína.

6.3. Efeitos da administração repetida combinada de testosterona e cocaína na pressão arterial basal e frequência cardíaca de ratos adolescentes e adultos

A figura 5 mostra os resultados dos efeitos da administração repetida combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) durante 10 dias na

pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) de ratos adolescentes e adultos.

Pressão Arterial Média (PAM)

ANOVA não demonstrou diferenças significativas na PAM considerando o fator tratamento [$F_{(3,35)} = 1,77$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator idade [$F_{(3,35)} = 11,21$; $p < 0,05$]. Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores tratamento e idade [$F_{(3,35)} = 7,29$; $p < 0,05$].

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, considerando o fator interação, mostrou que a PAM do grupo de animais adultos que receberam o tratamento repetido de testosterona e cocaína foi significativamente diferente quando comparado ao seu controle (veículo - salina) ($p < 0,05$) e quando comparado com o grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Pressão Arterial Diastólica (PAD)

ANOVA demonstrou diferenças significativas na PAD considerando o fator tratamento [$F_{(3,35)} = 7,91$; $p < 0,05$] e o fator idade [$F_{(3,35)} = 40,36$; $p < 0,05$]. Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores tratamento e idade [$F_{(3,35)} = 4,70$; $p < 0,05$].

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, considerando o fator interação, mostrou que a PAD do grupo de animais adultos que receberam o tratamento repetido de testosterona e cocaína foi significativamente diferente quando comparado ao seu controle (veículo -

salina) ($p < 0,05$) e quando comparado com o grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Pressão Arterial Sistólica (PAS)

ANOVA não demonstrou diferenças significativas na PAS considerando o fator tratamento [$F_{(3,35)} = 0,73$; $p > 0,05$]. Contudo, ANOVA revelou diferenças significativas para o fator idade [$F_{(3,35)} = 5,76$; $p < 0,05$]. Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores tratamento e idade [$F_{(3,35)} = 8,52$; $p < 0,05$].

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, considerando a interação, mostrou que a PAS do grupo de animais adultos que receberam o tratamento repetido de testosterona e cocaína foi significativamente diferente quando comparado ao seu controle (veículo - salina) ($p < 0,05$) e quando comparado com o grupo de animais adolescentes que receberam o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Frequência Cardíaca (FC)

ANOVA demonstrou diferenças significativas na FC considerando o fator tratamento [$F_{(3,35)} = 14,13$; $p < 0,05$] e o fator idade [$F_{(3,35)} = 83,38$; $p < 0,05$]. Além disso, foi observada interação significativa entre os fatores tratamento e idade [$F_{(3,35)} = 11,49$; $p < 0,05$].

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, considerando o fator tratamento, mostrou que a FC dos grupos de animais adolescentes que receberam o tratamento repetido de testosterona e salina e veículo cocaína foi significativamente menor quando comparado ao seu controle (veículo - salina)

($p < 0,05$). O mesmo foi observado para o grupo de animais adultos que receberam o tratamento repetido de testosterona e salina ($p < 0,05$).

Além disso, considerando o fator idade, os grupos adultos tratados repetidamente com veículo – salina, testosterona – salina, e testosterona – cocaína apresentaram diferença significativa menor quando comparados aos grupos adolescentes que receberam o mesmo tratamento ($p < 0,05$).

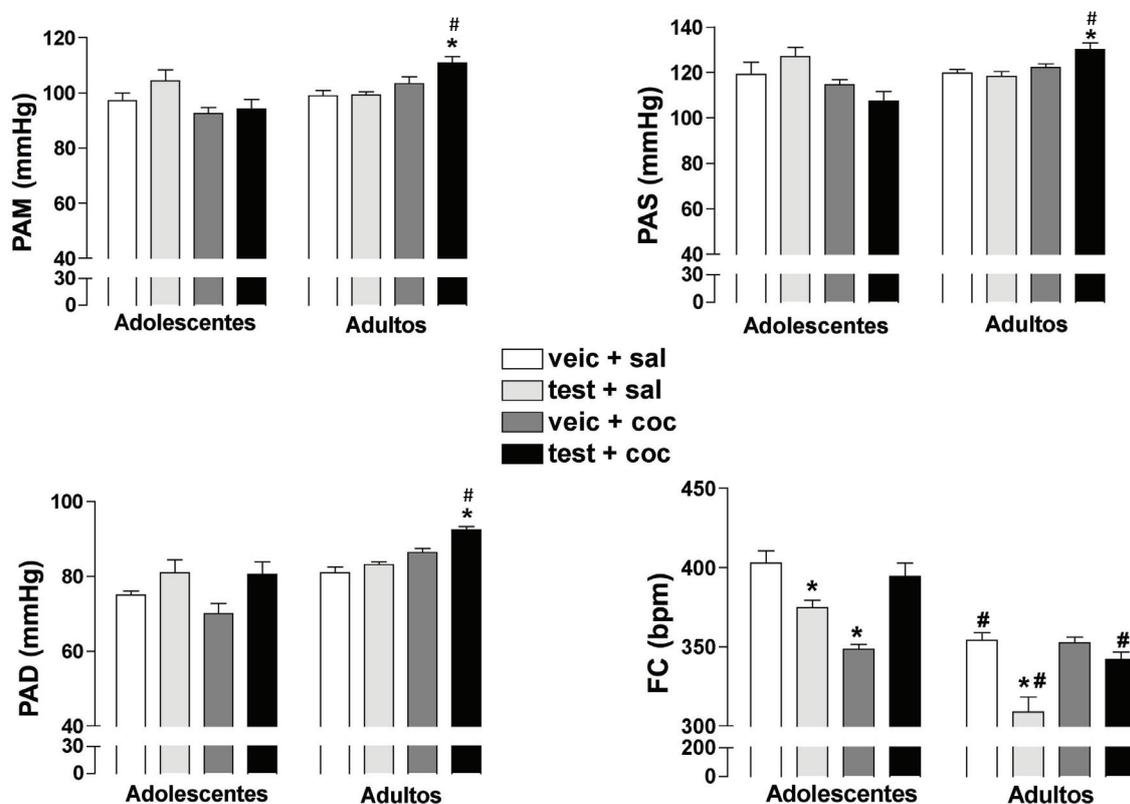


FIGURA 5 – PAM, PAS, PAD e FC de ratos adolescentes e adultos tratados repetidamente durante 10 dias com veículo-salina, veículo-cocaína, testosterona-salina ou testosterona-cocaína. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$: comparado ao respectivo grupo VEIC-SAL. # $p < 0,05$: comparado ao respectivo grupo adolescente.

6.4 Alterações histológicas no coração e fígado após a administração combinada de testosterona e cocaína

As figuras 6 A e B mostram, respectivamente, cortes histológicos (com objetiva 20x) de fígados de ratos adultos (n=22) e adolescentes (n=20) que receberam durante 10 dias administração combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg).

A análise qualitativa dos cortes histológicos de fígados mostrou que se apresentam divididos em septos os quais subdividem a glândula em lóbulos. Observaram-se vasos sanguíneos e ductos biliares que chegam até os ápices dos lóbulos (espaço porta). A partir dos espaços portas seguem conjuntos de hepatócitos com aspectos de normalidade, apresentando-se como poligonais e possuindo um ou dois núcleos sustentados por finos feixes de fibras de colágeno. O tratamento repetido com testosterona e cocaína não alterou as características histológicas dos fígados de ratos adultos e adolescentes.

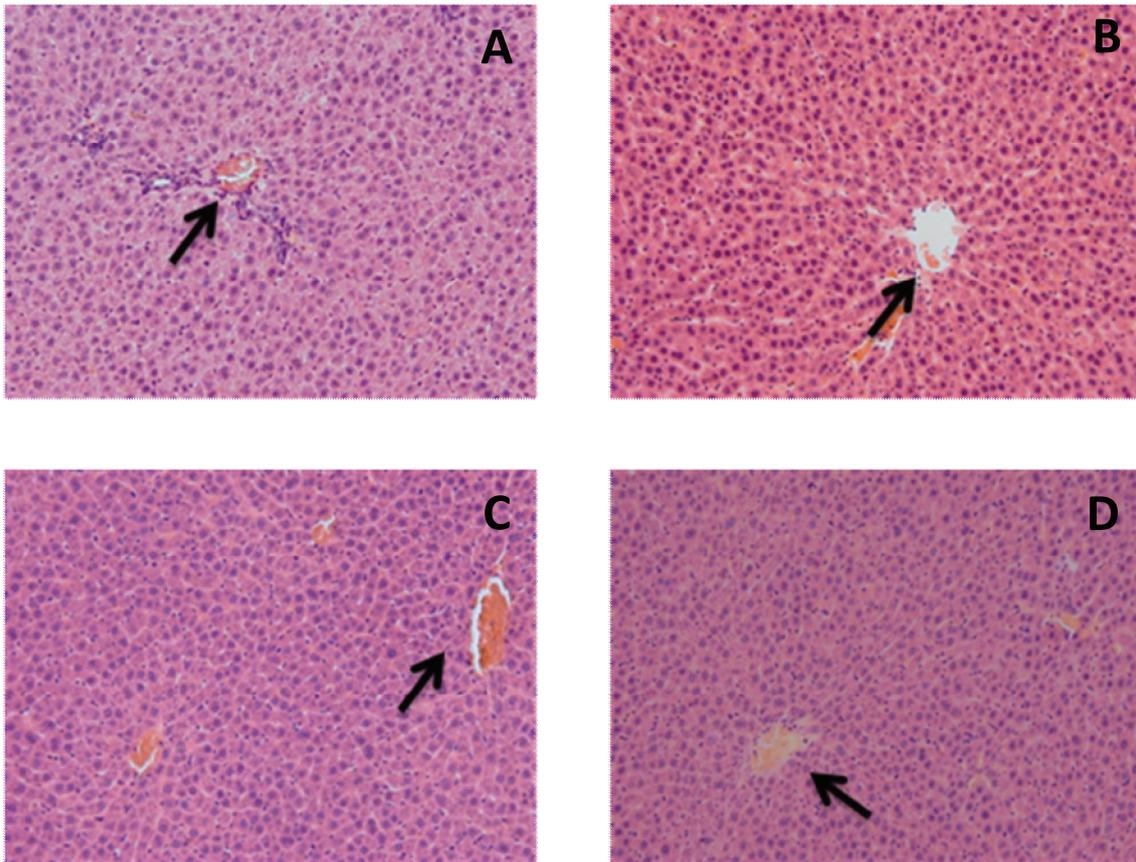


FIGURA 6A – Cortes histológicos de fígado de ratos adultos que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veiculo-salina, detalhe do ramo da veia porta. **B:** tratamento com veiculo-cocaína, detalhe do ramo da veia porta. **C:** tratamento com testosterona-salina, detalhe da veia central. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, detalhe da veia central. Todos os cortes, independente do tratamento, apresentaram características histopatológicas normais.

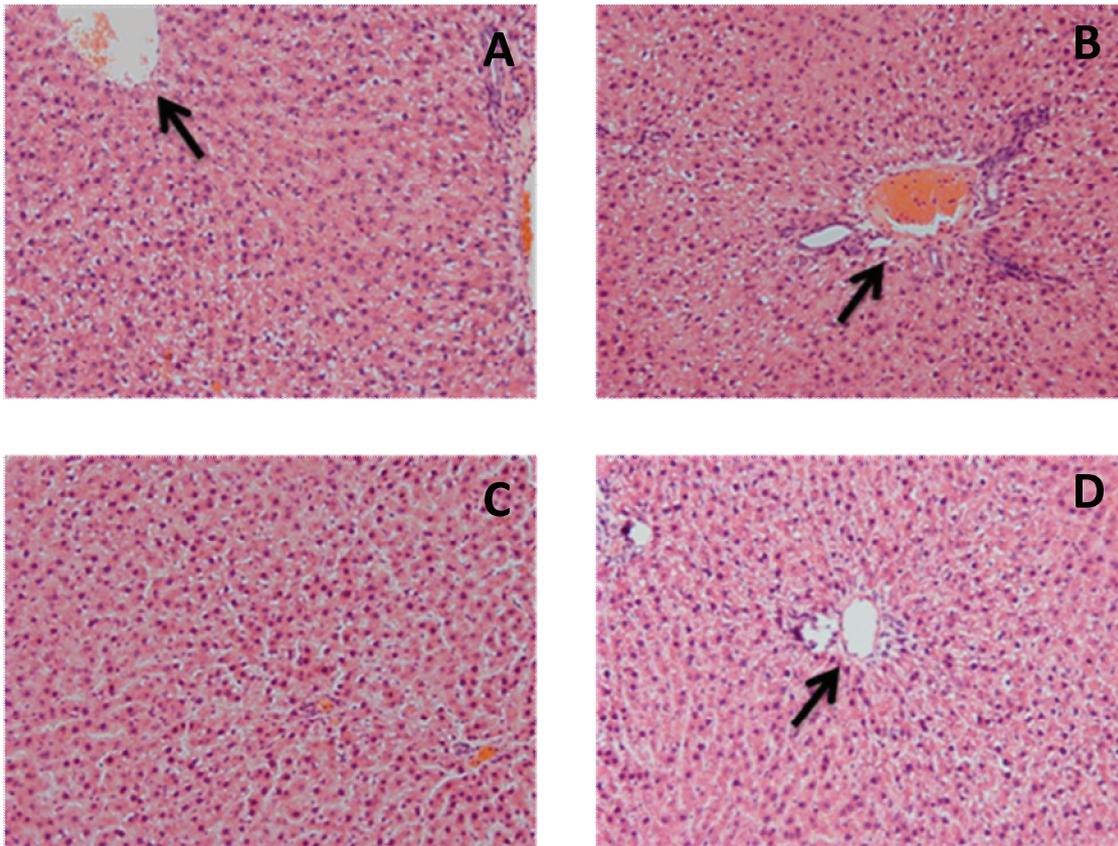


FIGURA 6B – Cortes histológicos de fígado de ratos adolescentes que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veiculo-salina, detalhe da veia central. **B:** tratamento com veiculo-cocaína, detalhe do ramo da veia porta. **C:** tratamento com testosterona-salina. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, detalhe do da veia porta. Todos os cortes, independente do tratamento, apresentaram características histopatológicas normais.

As figuras 7 A e B e 7 C e D mostram cortes histológicos (com objetiva 20x) de ventrículos esquerdos de corações de ratos adultos (n=22) e adolescentes (n=20) que receberam durante 10 dias administração combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg).

De modo geral, os músculos cardíacos dos grupos controles de ratos adultos e adolescentes apresentam ramificação das fibras musculares e nas suas extremidades prendem-se os discos intercalares nitidamente delineados. Os núcleos são relativamente basófilos muitas vezes ovais e bem localizados, isto é, estabelecem-se no centro das células. A estriação transversal das fibrilas nem sempre são evidenciadas e, quando são, mostram aspecto poligonal das fibras musculares com espaços intercelulares relativamente largos ocupados por suprimento vascular. Entre as fibras observam-se numerosos capilares e alguns vasos dilatados.

Os cortes do músculo cardíaco de ratos tratados com testosterona e/ou cocaína apresentam as mesmas características apresentadas. Entretanto, as imagens sugerem que a quantidade de áreas de rompimento das fibras é maior e mais espaçada, sem apresentarem fibrose. Os cortes mostram também aumento de vasos sanguíneos dilatados e acúmulo de sangue nas câmaras cardíacas.

As válvulas cardíacas e vasos maiores apresentaram-se semelhantes em todos os grupos estudados.

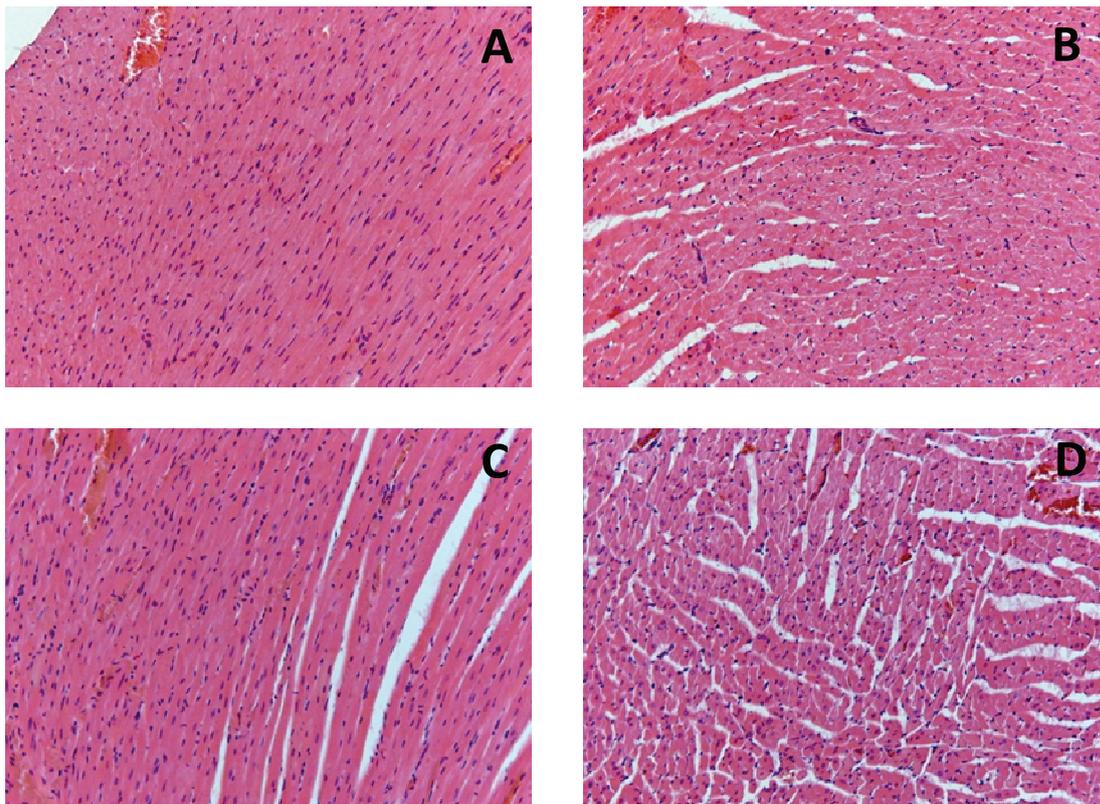


FIGURA 7A – Cortes histológicos de ventrículos esquerdos de corações de ratos adultos que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veiculo-salina, células com aspectos normais e sem espaçamento. **B:** tratamento com veiculo-cocaína, células com quantidade moderada de espaçamento. **C:** tratamento com testosterona-salina, células com quantidade moderada de espaçamentos. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, células com grande quantidade de espaçamentos.

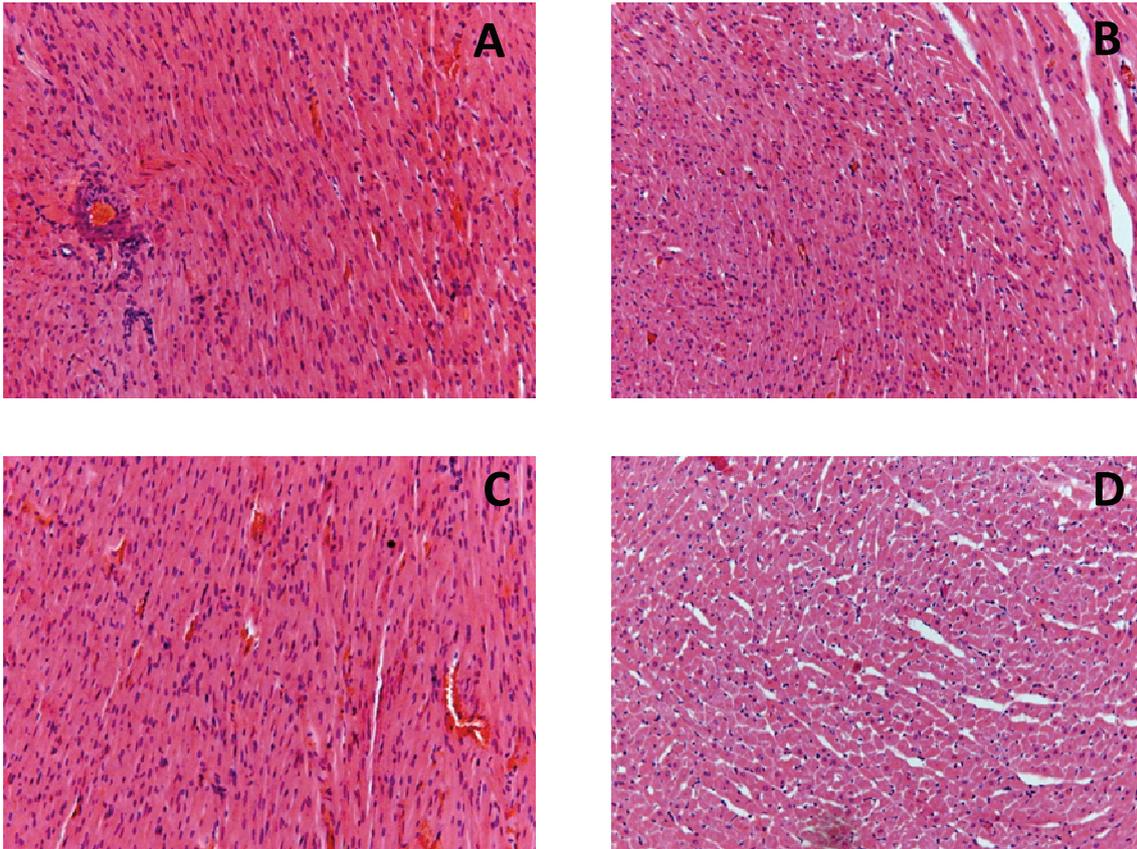


FIGURA 7B – Cortes histológicos de ventrículos esquerdos de corações de ratos adolescentes que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veículo-salina, células com aspectos normais e poucos espaçamentos. **B:** tratamento com veículo-cocaína, células com quantidade moderada de espaçamento. **C:** tratamento com testosterona-salina, células com poucos espaçamentos. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, células com grande quantidade de espaçamentos.

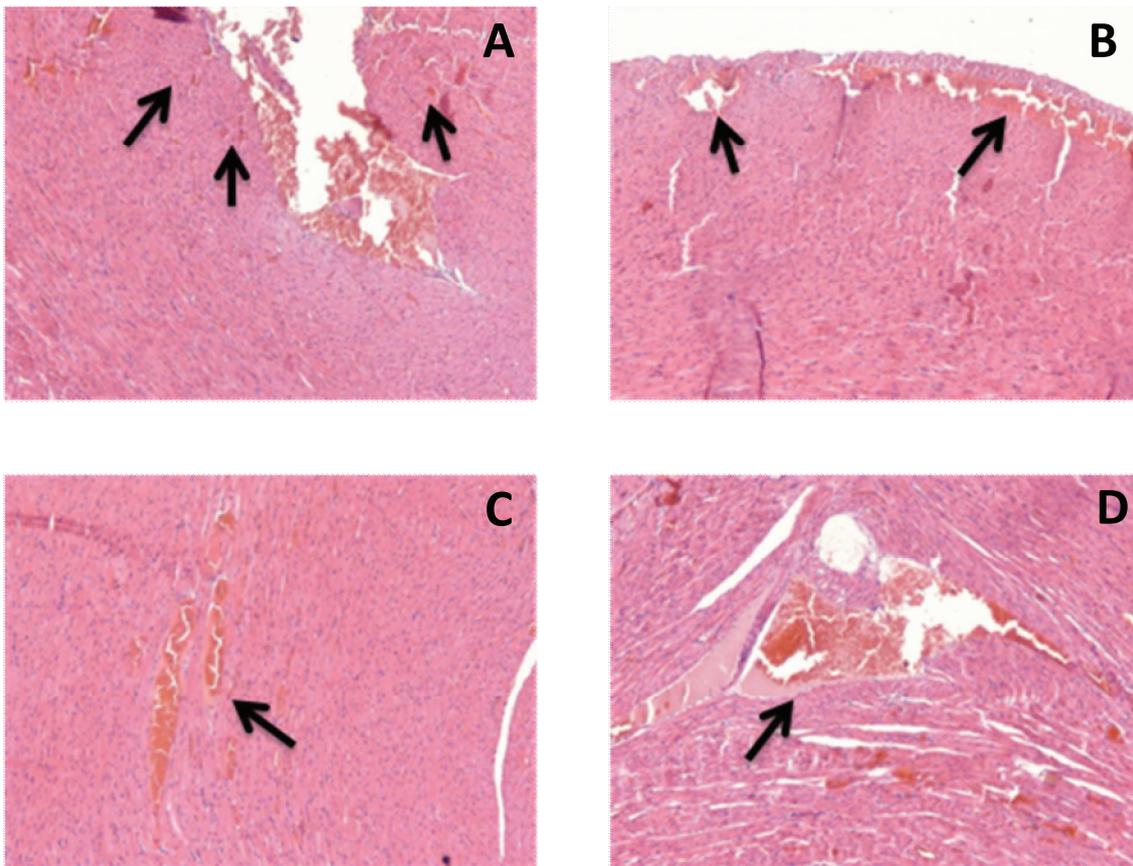


FIGURA 7C – Cortes histológicos de ventrículos esquerdos de corações de ratos adultos que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veiculo-salina, detalhe de vasos sanguíneos com aspectos normais. **B:** tratamento com veiculo-cocaína, detalhe de vasos sanguíneos dilatados. **C:** tratamento com testosterona-salina, detalhe de vasos sanguíneos dilatados. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, detalhe de vasos sanguíneos muito dilatados.

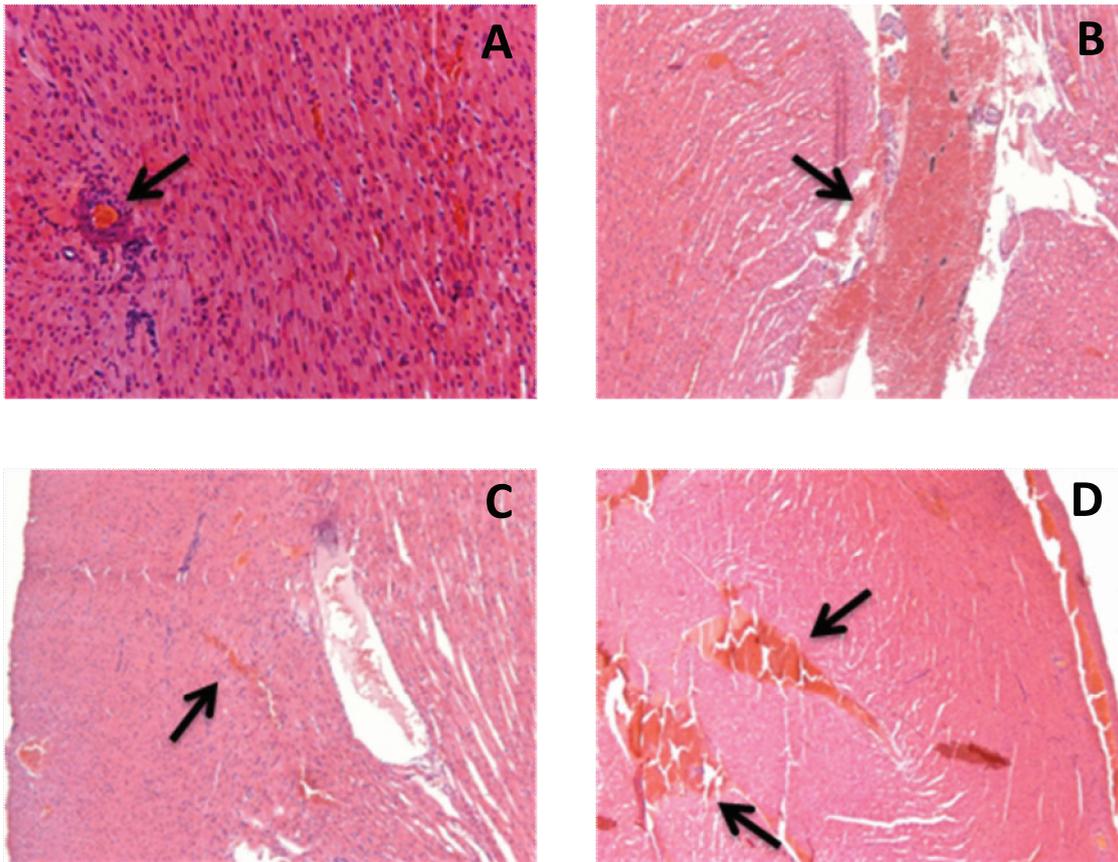


FIGURA 7D – Cortes histológicas de ventrículos esquerdos de corações de ratos adolescentes que receberam durante 10 dias administrações repetidas de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg). **A:** tratamento com veiculo-salina, detalhe de vaso sanguíneo com aspecto normal. **B:** tratamento com veiculo-cocaína, detalhe do acúmulo de sangue na câmara cardíaca. **C:** tratamento com testosterona-salina, detalhe de vaso sanguíneo com pouca dilatação. **D:** tratamento com testosterona-cocaína, vasos sanguíneos muito dilatados.

A figura 8 mostra os resultados dos efeitos da administração repetida combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) na espessura de ventrículos esquerdos de ratos adultos (A) (n=22) e adolescentes (B) (n=20).

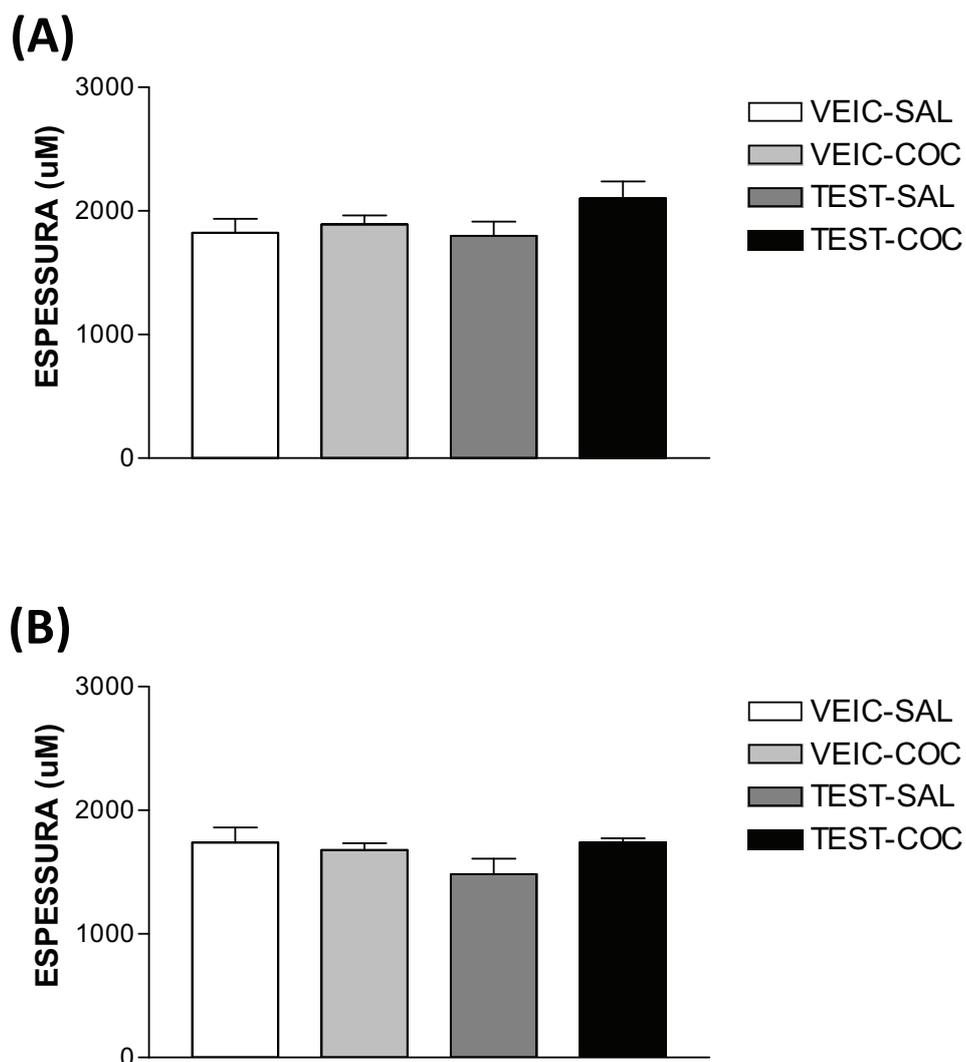


FIGURA 8– Espessura dos ventrículos esquerdos de corações de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg, s.c.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.). Os dados representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do ventrículo esquerdo [$F_{(3,18)} = 1,68$; $p > 0,05$] (FIGURA 8A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do ventrículo esquerdo [$F_{(3,16)} = 2,36$; $p > 0,05$] (FIGURA 8B).

A figura 9 mostra os resultados dos efeitos da administração repetida combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) na espessura de ventrículos direitos de ratos adultos (A) (n=21) e adolescentes (B) (n=20).

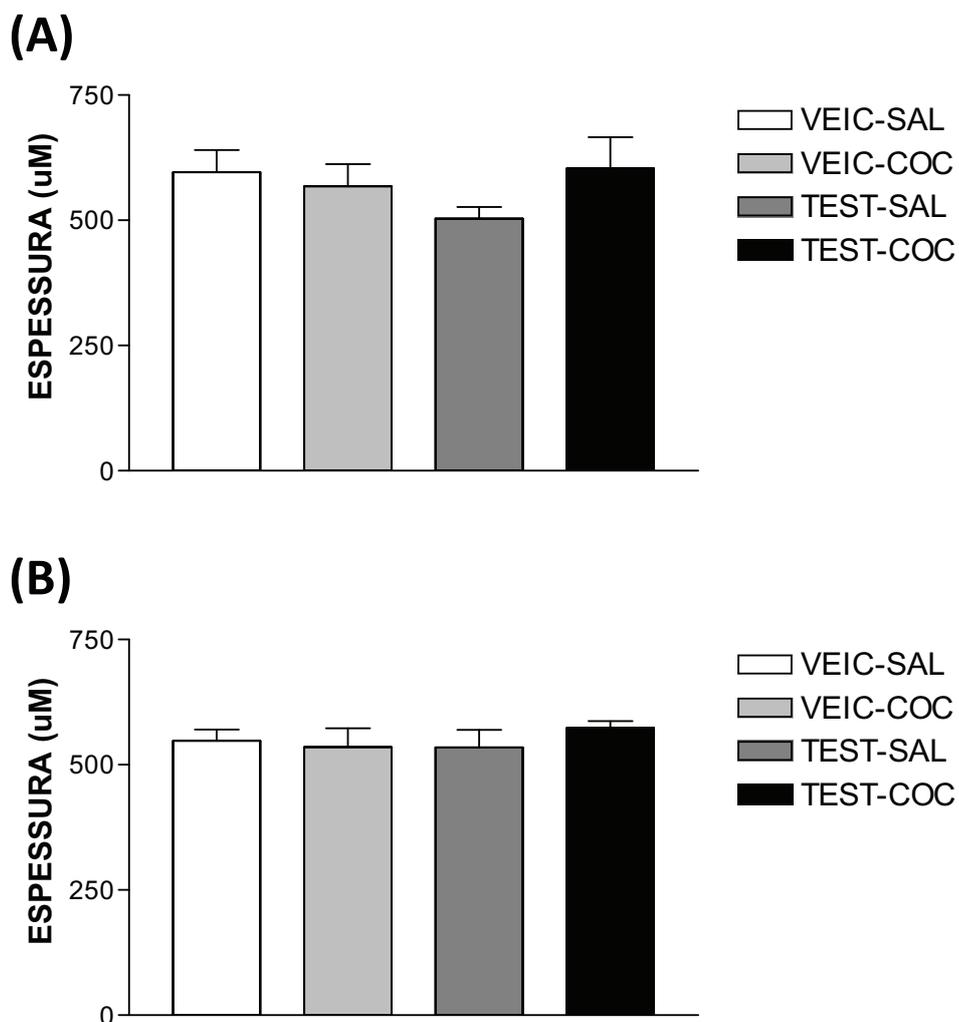


FIGURA 9 – Espessura dos ventrículos direitos de corações de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg, s.c.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.). Os dados representam a média \pm EPM de 4-6 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do ventrículo direito [$F_{(3,17)} = 1,43$; $p > 0,05$] (FIGURA 9A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do ventrículo direito [$F_{(3,16)} = 0,56$; $p > 0,05$] (FIGURA 9B).

A figura 10 mostra os resultados dos efeitos da administração repetida combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) na espessura de átrios esquerdos de ratos adultos (A) (n=22) e adolescentes (B) (n=20).

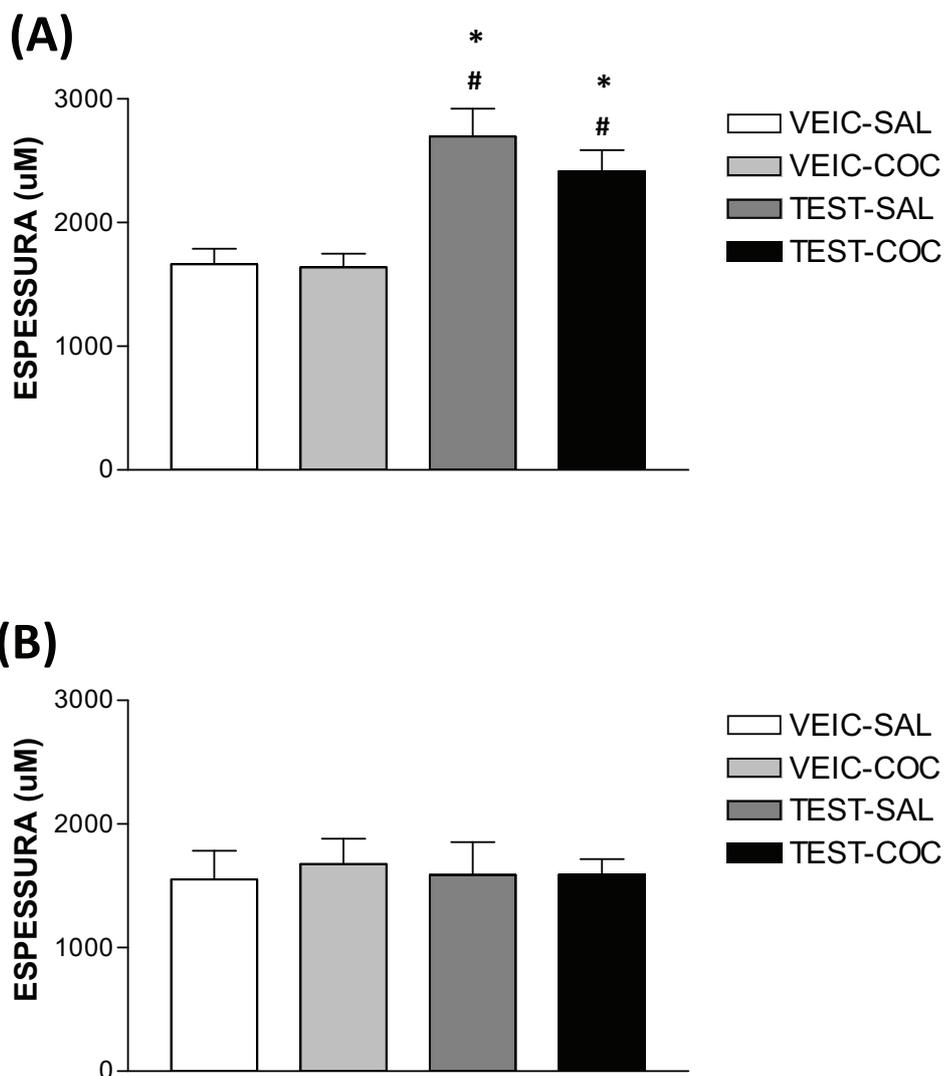


FIGURA 10 – Espessura dos átrios esquerdos de corações de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg, s.c.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.). Os dados representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$: comparados ao grupo VEIC-SAL. # $p < 0,05$: comparados ao grupo VEIC-COC.

Nos ratos adultos, ANOVA demonstrou diferenças significativas na hipertrofia da parede do átrio esquerdo [$F_{(3,18)} = 13,28$; $p < 0,05$] (FIGURA 10A).

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, mostrou que ambos os grupos tratados com testosterona-salina e testosterona-cocaína foram significativamente diferentes dos grupos tratados com veiculo-salina e veiculo-cocaína ($p < 0,05$).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na hipertrofia da parede do átrio esquerdo [$F_{(3,16)} = 0,09$; $p > 0,05$] (FIGURA 10B).

A figura 11 mostra os resultados dos efeitos da administração repetida combinada de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) na espessura de átrios direitos de ratos adultos (A) (n=22) e adolescentes (B) (n=20).

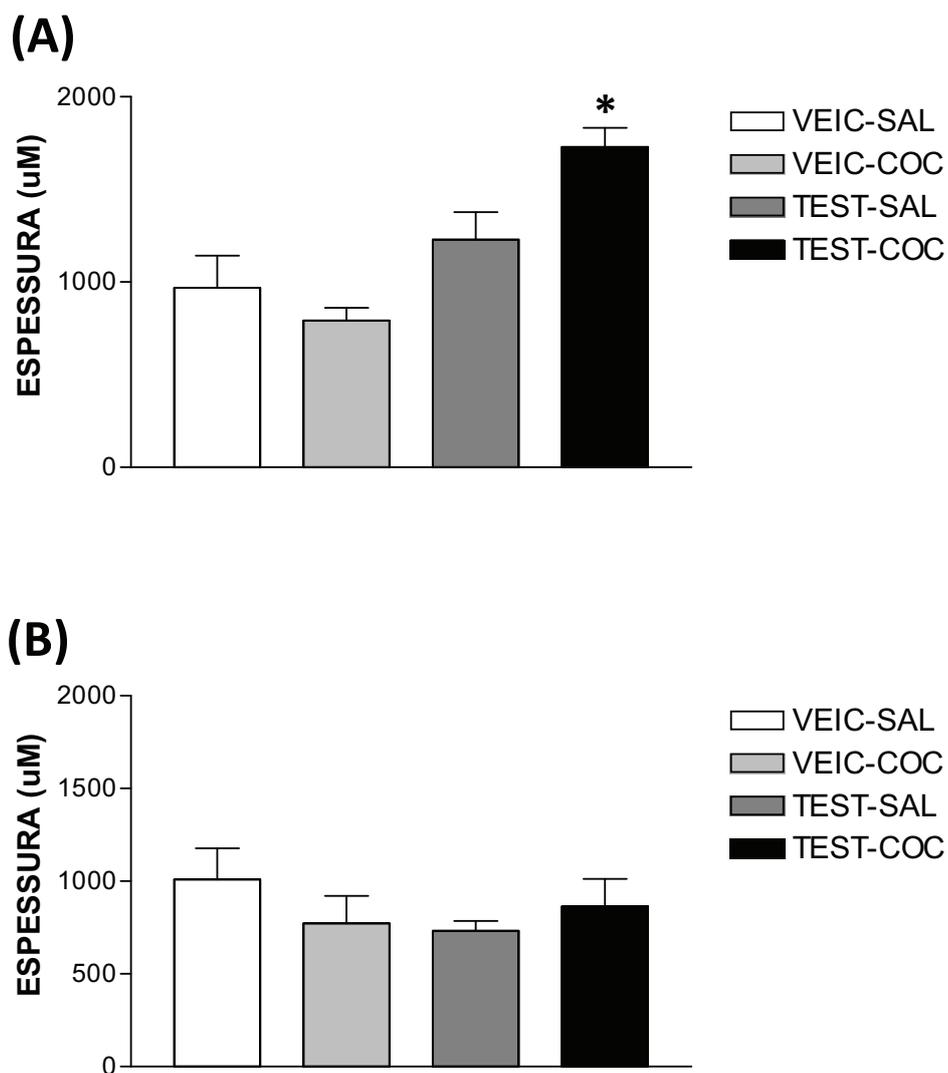


FIGURA 11 – Espessura dos átrios direitos de corações de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg, s.c.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.). Os dados representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. *p<0,05: comparados aos demais grupos.

Nos ratos adultos, ANOVA demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do átrio direito [$F_{(3,18)} = 12,72$; $p < 0,05$] (FIGURA 11A).

A comparação múltipla das médias pelo teste Bonferroni, mostrou que o grupo tratado com testosterona-cocaína foi significativamente diferente de todos os outros grupos ($p < 0,05$).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas na espessura da parede do átrio direito [$F_{(3,16)} = 1,22$; $p > 0,05$] (FIGURA 11B).

6.5. Efeitos no coração e fígado decorrentes da administração crônica de testosterona e cocaína

A figura 12 mostra os resultados dos efeitos tóxicos no fígado decorrentes da administração repetida de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) durante 10 dias em ratos adultos (A) e adolescentes (B). Para tanto foi realizado o ensaio enzimático alanina aminotransferase (ALT) como parâmetro.

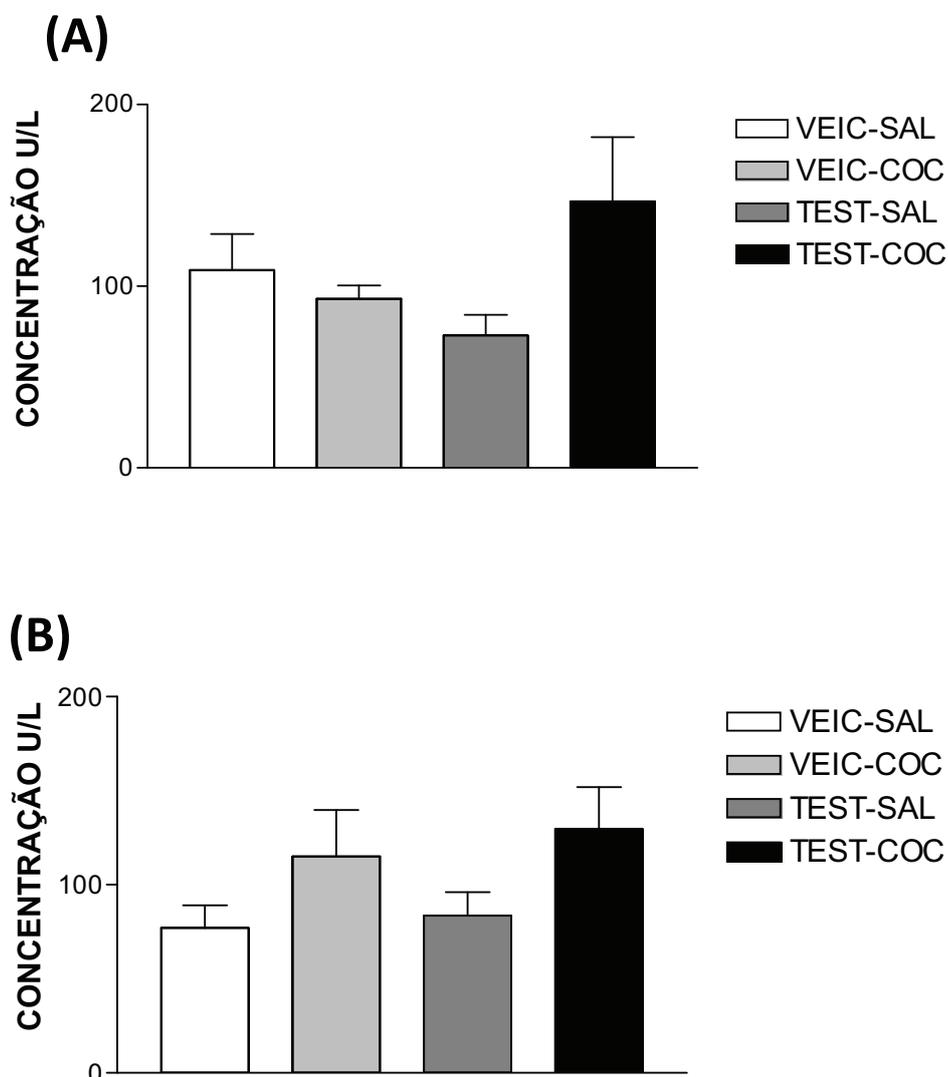


FIGURA 12 – Concentração da enzima ALT de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente com testosterona e cocaína durante 10 dias. Os dados representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima alanina aminotransferase (ALT) [$F_{(3,23)} = 2,42$; $p > 0,05$] (FIGURA 12A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima alanina aminotransferase (ALT) [$F_{(3,23)} = 2,81$; $p > 0,05$] (FIGURA 12B).

A figura 13 mostra os resultados dos efeitos tóxicos no fígado decorrentes da administração repetida de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) durante 10 dias em ratos adultos (A) e adolescentes (B). Para tanto foi realizado o ensaio enzimático aspartato transaminase (AST) como parâmetro.

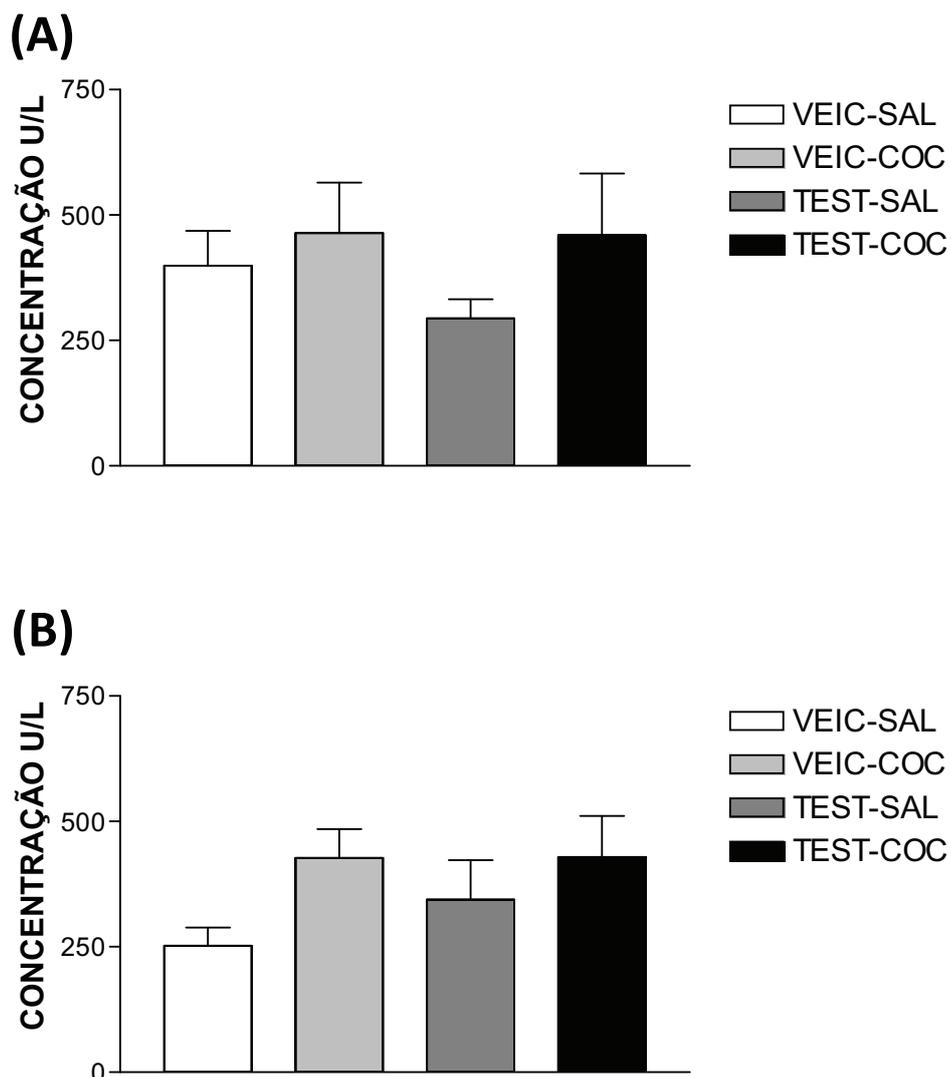


FIGURA 13 – Concentração da enzima AST de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente com testosterona e cocaína durante 10 dias. Os dados representam a média \pm EPM de 3-5 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima aspartato transaminase (AST) [$F_{(3,23)} = 0,91$; $p > 0,05$] (FIGURA 13A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima aspartato transaminase (AST) [$F_{(3,23)} = 2,35$; $p > 0,05$] (FIGURA 13B).

A figura 14 mostra os resultados dos efeitos tóxicos no fígado decorrentes da administração repetida de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) durante 10 dias em ratos adultos (A) e adolescentes (B). Para tanto foi realizado o ensaio enzimático fosfatase alcalina como parâmetro.

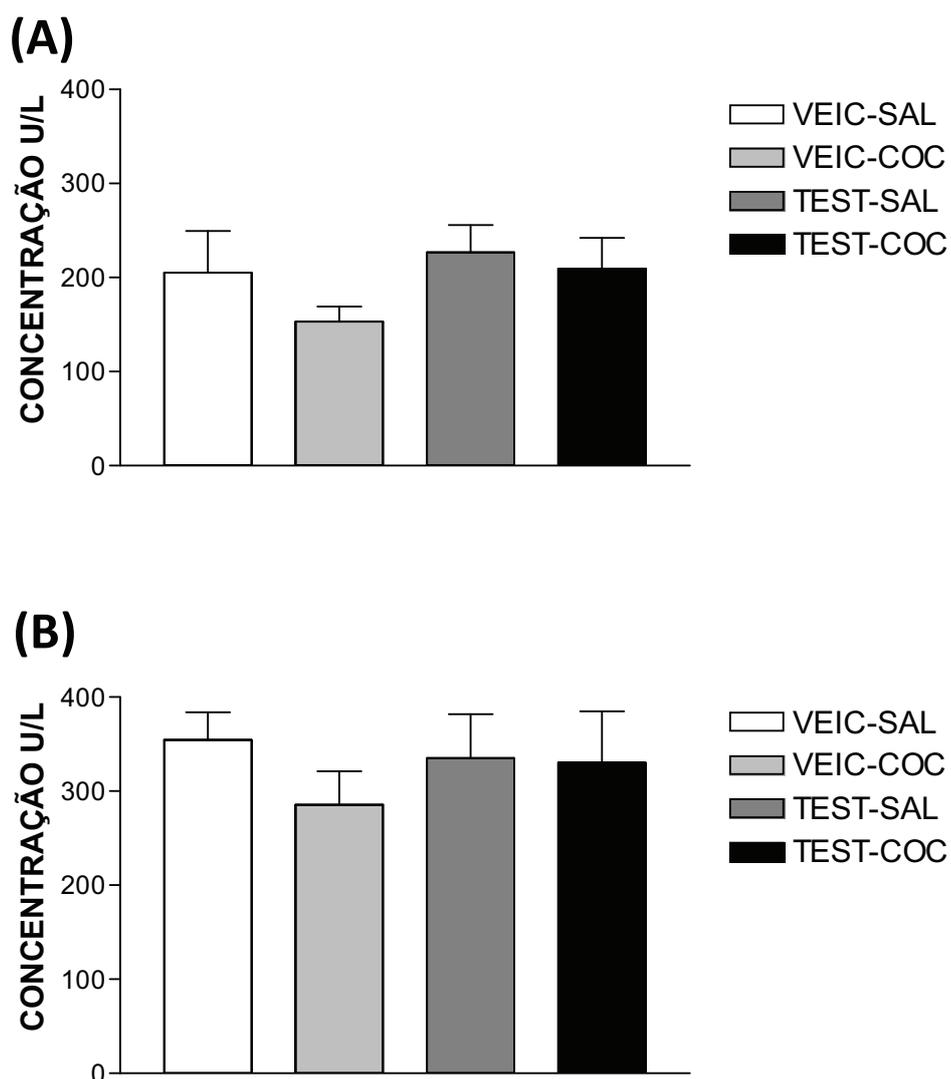


FIGURA 14 – Concentração da enzima fosfatase alcalina de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente com testosterona e cocaína durante 10 dias. Os dados representam a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima fosfatase alcalina [$F_{(3,23)} = 1,02$; $p > 0,05$] (FIGURA 14A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima fosfatase alcalina [$F_{(3,23)} = 0,67$; $p > 0,05$] (FIGURA 14B).

A figura 15 mostra os resultados dos efeitos tóxicos no coração decorrentes da administração repetida de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) durante 10 dias em ratos adultos (A) e adolescentes (B). Para tanto foi realizado o ensaio enzimático creatina-quinase MB (CK-MB) como parâmetro.

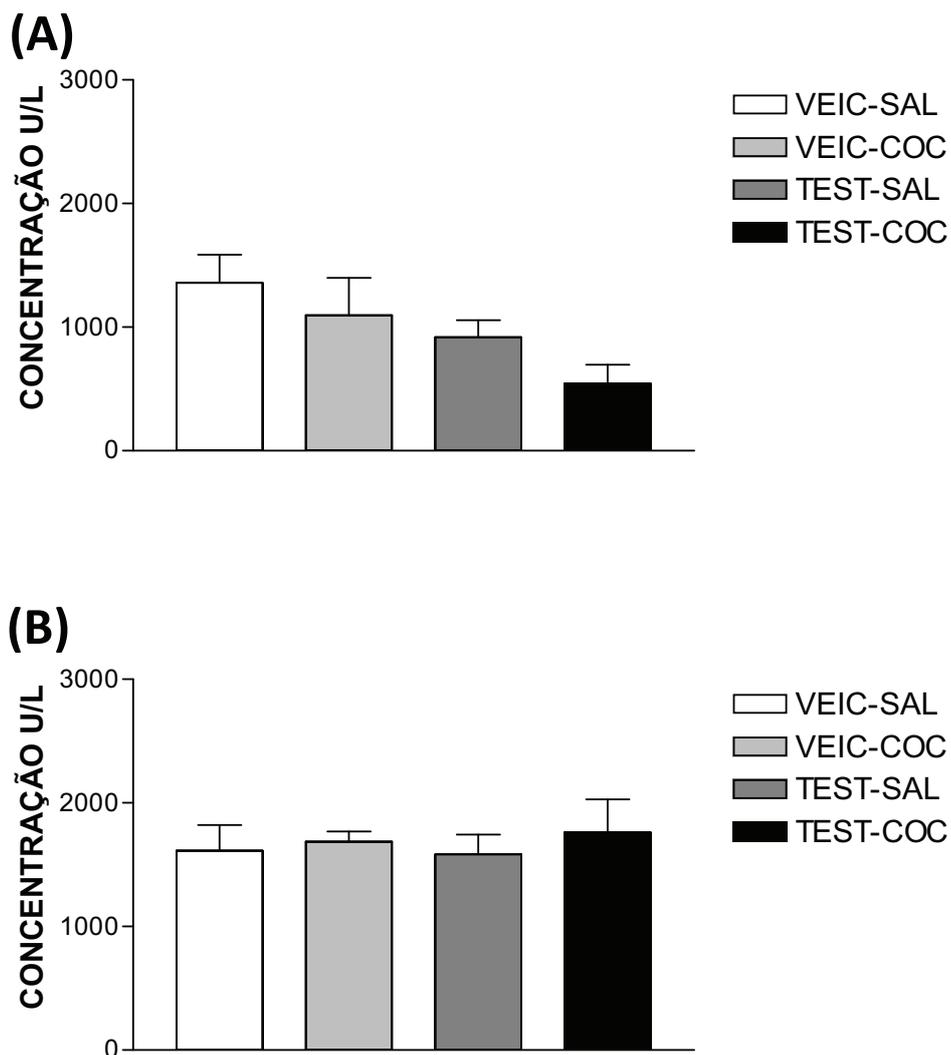


FIGURA 15 – Concentração da enzima CK-MB de ratos adultos (A) ou adolescentes (B) tratados repetidamente com testosterona e cocaína durante 10 dias. Os dados representam a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo.

Nos ratos adultos, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima CK-MB [$F_{(3,23)} = 2,83$; $p > 0,05$] (FIGURA 15A).

Nos ratos adolescentes, ANOVA não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros da enzima CK-MB [$F_{(2,23)} = 0,24$; $p > 0,05$] (FIGURA 15B).

7. DISCUSSÃO

O abuso de drogas tem aumentado nos últimos anos, e atualmente é considerado um grande problema de saúde pública no mundo. E assim como o uso de cocaína, o uso de EAAs também tem aumentado no mundo (DAWSON et al., 2001; POPE et al., 2009; CEBRID, 2005).

Vários autores relatam a possível participação dos EAAs na modulação do sistema dopaminérgico, que esta relacionada com o desenvolvimento da dependência (JOHANSON et al., 2000; QUIÑONES-JENAB et al., 2001; TRIEMSTRA et al., 2007). Além disso, a literatura é vasta quanto aos efeitos adversos do uso de EAAs e cocaína em sistemas complexos, tais como o sistema hepático e cardiovascular, causando patologias e mortes súbitas (JUHN, 2003; D'ANDREA et al., 2007; KRIEG et al., 2007; SANCHÉS-OSORIO et al., 2007; KANAYAMA et al., 2008; KANAYAMA et al., 2009; WEINER et al., 2009).

Assim, nosso estudo dedicou-se à investigação do possível desenvolvimento de sensibilização comportamental cruzada entre testosterona e cocaína em ratos adultos e adolescentes. Uma vez que uso de EAAs e cocaína ocorre concomitantemente, nosso estudo também investigou as consequências adversas do uso simultâneo repetido dessas substâncias sobre o fígado e funções cardiovasculares.

O pré-tratamento agudo com testosterona não alterou a atividade locomotora em ratos adolescentes e adultos após a injeção de cocaína, 45 minutos ou 3 dias, após a administração aguda de testosterona. Esses resultados corroboram outros estudos, em ratos adultos, demonstrando que a administração aguda de testosterona não altera a resposta locomotora à

cocaína (LONG et al., 1994; MARTINEZ-SANCHIS et al., 1996; MENENDEZ-DELMESTRE et al., 2010).

Diferentemente de nossos resultados, Minerly et al. (2010) demonstraram que ratos adolescentes apresentaram aumento da atividade locomotora induzida pela cocaína (20 mg/kg) após injeção aguda de propionato de testosterona (5 ou 10 mg/kg). No mesmo sentido, Martínez-Sanchis et al. (2002) demonstraram que a administração aguda de testosterona (10 mg/kg) causou um aumento na atividade locomotora induzida pela cocaína (10 mg/kg) em camundongos adolescentes. Juntos esses resultados sugerem que os efeitos da testosterona na atividade locomotora induzida pela cocaína durante a adolescência possam depender do tipo de EAA e da espécie estudada.

Nossos resultados demonstram que a administração repetida de testosterona causou sensibilização comportamental à cocaína em ratos adolescentes, mas não em ratos adultos. A sensibilização comportamental decorre de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico que são relacionadas à transição do uso controlado para o uso compulsivo das substâncias psicoativas (ROBINSON & BERRIDGE, 2001). A sensibilização comportamental já foi descrita para a cocaína, anfetamina, etanol, morfina, nicotina, delta-9-THC e heroína (ROBINSON & BECKER, 1986; KALIVAS & DUFFY, 1987; MISERENDINO & NESTLER, 1995; CADONI et al., 2001; MARIN & PLANETA, 2004; CRUZ et al., 2005; LENOIR & AHMED, 2007). Dessa forma, foi sugerido que todas as substâncias psicoativas que induzem dependência são reforçadores positivos e

promovem sensibilização comportamental (WISE & BOZARTH, 1987; ROBINSON & BERRIDGE, 1993).

Estudos têm demonstrado que o tratamento repetido com uma determinada substância pode aumentar a resposta locomotora a subsequente administração de outra substância psicoativa. Este fenômeno é chamado de sensibilização cruzada (CUNNINGHAM & KELLEY, 1992). A sensibilização cruzada já foi demonstrada entre nicotina e cocaína (COLLINS and IZENWASSER, 2004) e entre anfetamina e nicotina (SANTOS et al., 2009). Considerando a teoria da sensibilização do incentivo, esses resultados sugerem que a exposição previa a uma substância pode aumentar a vulnerabilidade à dependência de outra.

A sensibilização cruzada entre testosterona e cocaína em adolescentes, observada no presente estudo, sugere que esse EAA pode induzir neuroplasticidades nos circuitos neurais relacionados à ativação psicomotora induzida pela cocaína. Assim, o uso de testosterona poderia influenciar a vulnerabilidade ao abuso e dependência de cocaína (MINERLY et al., 2010).

Poucos estudos dedicaram-se à investigação dos efeitos da administração repetida de testosterona nas respostas comportamentais à cocaína em ratos. Por exemplo, Kailanto et al. (2011) demonstraram que a administração por 10 dias de nandrolona (20 mg/kg) atenuou a atividade locomotora induzida pela cocaína em ratos adultos. Por outro lado, Martínez-Sanchis et al. (1996) demonstraram que o tratamento com estanozolol durante 21 dias não causou efeitos na atividade locomotora de camundongos adolescentes e adultos. A diferença entre esses estudos e o nosso poderia ser

a utilização de EAAs de meia – vida longa, diferente da testosterona que tem meia vida curta.

Chin et al. (2002) demonstraram que ratos adultos intactos (quando os animais estavam sob efeito de testosterona endógena) que receberam repetidamente administrações de cocaína (15 mg/kg) desenvolveram sensibilização comportamental a essa substância, enquanto que esse efeito não foi observado em ratos gonadectomizados, sugerindo assim uma possível participação da testosterona endógena na mediação de alguns aspectos relacionados à sensibilização comportamental à cocaína.

A sensibilização comportamental está relacionada com o aumento da transmissão dopaminérgica no sistema mesocorticolímbico (WISE & BOZARTH, 1987; NESTLER and AGHAJANIAN, 1997; KOOB & LE MOAL, 2001). Os principais componentes desse sistema são a área tegmental ventral (VTA) e suas projeções para o sistema límbico, que inclui o núcleo accumbens, amígdala e o córtex pré-frontal (WISE & BOZARTH, 1987; KOOB & LE MOAL, 2001). Dessa maneira, a administração repetida de drogas de abuso, especialmente psicoestimulantes, causam alterações moleculares similares nesse sistema.

Thiblin et al. (1999) demonstraram que o tratamento repetido (6 semanas) de oximetolona (5 mg/ml) aumentou a concentração de dopamina no estriado de ratos adultos. No mesmo estudo, estes autores demonstraram que o tratamento com propionato de testosterona (5 mg/ml) aumentou a concentração de DOPAC (um metabólito da dopamina), que reflete o aumento da liberação de dopamina. Juntos, esses estudos sugerem aumento da

atividade dopaminérgica em áreas relacionadas à motivação e emoções que poderiam estar relacionadas com alguns efeitos promovidos pelo uso de EAAs, tais como euforia, aumento da autoestima e confiança (THIBLIN et al., 1999).

De acordo com a literatura recente, os EAA podem causar síndrome da dependência e esta divide muitas características com a dependência de outras substâncias psicoativas, como a cocaína (KANAYAMA, et al., 2009). Por exemplo, os esteroides atuam como reforçadores positivos em modelos animais de autoadministração, e também podem produzir síndrome de abstinência característica (KANAYAMA, et al., 2009).

Neuroadaptações no sistema dopaminérgico foram observadas após administrações de testosterona. Nesse sentido, Birgner et al. (2008) demonstraram que a administração de nandrolona (3 ou 15 mg/kg), durante 14 dias, em ratos adultos causou aumento do RNAm do receptor dopaminérgico do subtipo D4 no núcleo acumbens, diminuição do RNAm do subreceptor tipo D1 no hipocampo e aumento do RNAm do receptor tipo D1 na amígdala, evidenciando neuroplasticidades nos sistemas relacionados ao desenvolvimento e manutenção da dependência, após administração crônica de EAAs.

Além disso, outros autores demonstraram que a testosterona parece ter uma ação no sistema opioidérgico. Dessa maneira, Johanson et al. (1997) demonstraram que ratos que receberam nandrolona (5 ou 15 mg/kg) por 14 dias apresentaram aumento de β -endorfina na VTA, e num estudo posterior semelhante (2000), demonstraram aumento de dinorfina e encefalina no hipocampo e estriado, relatando um desbalanço desses dois peptídeos opióides

nessas regiões. Dessa maneira, os efeitos da administração repetida de testosterona na atividade locomotora induzida pela cocaína em ratos adolescentes poderiam estar relacionados com estas neuroplasticidades de outros sistemas, tal como o sistema opioide. Para tanto, novos estudos são necessários para confirmar tal suposição.

Resumindo, a administração repetida de testosterona causou sensibilização comportamental à cocaína em ratos adolescentes. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que a administração repetida de EAAs poderia aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência. Contudo, novos estudos em modelos animais são necessários para confirmar o mecanismo molecular da interação entre testosterona e cocaína no desenvolvimento da dependência.

A literatura sobre os efeitos periféricos da administração isolada de testosterona e cocaína é ampla (JUHN, 2003; D'ANDREA et al., 2007; KRIEG et al., 2007; SANCHÉS-OSORIO et al., 2007; KANAYAMA et al., 2008; KANAYAMA et al., 2009; WEINER et al., 2009). Contudo, poucos são os estudos que se dedicaram à investigação dos efeitos adversos referentes à administração combinada dessas duas substâncias.

Assim, o presente estudo também investigou os efeitos tóxicos do uso repetido e combinado de testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) em alguns parâmetros cardiovasculares e órgãos periféricos de ratos adolescentes e adultos. Esse estudo foi delineado em decorrência do crescente número de casos do uso da associação de testosterona e cocaína (DURANT et al., 1993;

CEBRID, 2005; NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2009; MINERLY et al., 2010).

Nossos resultados demonstram que ratos adultos tratados durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) apresentaram aumento da pressão arterial média, aumento da pressão arterial sistólica e aumento da pressão arterial diastólica, quando comparados com seus controles. Contudo, esses efeitos não foram observados em ratos adolescentes que receberam o mesmo tratamento. O aumento da pressão arterial média também foi observado quando se comparou ratos adultos com ratos adolescentes que receberam o mesmo tratamento.

Nossos resultados corroboram com os de Tseng et al. (1994). Esses autores demonstraram que a administração combinada de nandrolona e cocaína durante 6 semanas acelerou o desenvolvimento de hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos. No mesmo sentido, estudos "in vitro" demonstraram que EAAs são capazes de potencializar os efeitos cardiovasculares da cocaína (PHILLIS et al., 2000; TOGNA et al., 2003). Contudo, os mecanismos pelo qual a administração combinada repetida de testosterona e cocaína induz aumento de pressão arterial ainda não são totalmente entendidos.

O tratamento repetido combinado com testosterona e cocaína não afetou a frequência cardíaca basal de ratos adultos e adolescentes quando comparados aos grupos controles, sugerindo que o aumento da pressão arterial observado nos animais adultos do grupo tratado com testosterona e cocaína não ocorreu em decorrência de possíveis mudanças na frequência

cardíaca desses mesmos animais. Contudo, ratos adultos e adolescentes que receberam durante 10 dias testosterona e salina, apresentaram diminuição da frequência cardíaca (bradicardia) quando comparados com seus respectivos controles, esse fenômeno também foi observado em ratos adolescentes que receberam durante esse mesmo período veículo e cocaína.

A bradicardia de repouso observada em nosso estudo também foi observada por Beutel et al. (2005) num estudo em que administraram durante 8 semanas estanozolol. Todos os esteroides atravessam a barreira hematoencefálica e podem agir em regiões do sistema nervoso central relacionadas à regulação cardiovascular. Além disso, a expressão de receptores de androgênios em regiões como o núcleo ambíguo e no núcleo dorsal motor do vago foram observadas (GORLICK e KELLEY, 1986). Dessa maneira, a testosterona poderia agir em neurônios pré – ganglionares vagais do tronco encefálico e facilitar a atividade parassimpática cardíaca e assim promover a bradicardia de repouso observada em nosso estudo. Contudo, existem evidências de que a testosterona facilite a atividade simpática de ratos (LARA et al., 1985; KUMAI et al., 1994).

Michels et al. (2006) demonstraram que a exposição a longo prazo de cardiomiócitos de ratos à testosterona aumentou o influxo de cálcio, sugerindo que esse hormônio poderia desempenhar um mecanismo responsável pelo aumento de frequência cardíaca, contratilidade cardíaca e condução atrioventricular. Contudo, nossos resultados de diminuição de frequência cardíaca em ratos tratados com testosterona não parecem estar relacionados a uma ação direta dessa substância no coração.

Além desses resultados, também observamos que ratos adultos dos grupos “veículo-salina”, “testosterona-salina” e “testosterona-cocaína” apresentaram frequência cardíaca menor quando comparados com os respectivos grupos de adolescentes. Dessa maneira, é evidente que ratos adultos e adolescentes apresentam frequências cardíacas basais diferentes e respostas distintas à testosterona e cocaína. Entretanto, novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nas diferenças entre funções cardiovasculares de ratos adultos e adolescentes.

Os órgãos dos animais tratados durante 10 dias com testosterona (10 mg/kg) e cocaína (20 mg/kg) também foram retirados para análises histológicas. Nossos resultados demonstram que ratos adultos e adolescentes tratados repetidamente com testosterona e cocaína apresentaram células hepáticas com aspectos normais.

A maioria das disfunções hepáticas induzidas por EAAs esta associada a esteróides alquilados na posição 17- α da molécula da testosterona (FRIEDL, 2000; SNYDER, 2001). Essa mudança da molécula da testosterona tem como objetivo retardar a metabolização hepática do esteroide, isso aumenta o tempo de meia vida e conseqüentemente o tempo de exposição do organismo aos seus efeitos (LISE et al., 1999).

A literatura é ampla quanto aos danos hepáticos decorrentes da administração de cocaína (EVANS e HARBISON, 1978; NDIKUM-MOFFOR e ROBERTS, 2003; SANCHÉS-OSORIO et al., 2007; KANAYAMA et al., 2009). Contudo seus mecanismos de ação ainda não são totalmente entendidos,

sendo necessários outros estudos para confirmarem o efeito tóxico da combinação de testosterona e cocaína.

Nossos resultados também demonstram que ratos adultos e adolescentes que foram tratados repetidamente com testosterona apresentaram rompimento moderado entre as células cardíacas, mas não foram encontradas evidências de fibrose. Dessa maneira, esse espaçamento entre os miócitos poderia ser um indicativo de edema em decorrência do tratamento repetido com testosterona. Esses resultados corroboram os achados por Hassan et al. (2009), que demonstraram que ratos adultos que receberam undecanoato de testosterona durante 8 semanas (1 injeção por semana) apresentaram áreas focais de degeneração e perda de estriação de tecido cardíaco, além de processo inflamatório no espaçamento entre os miócitos. Observamos que esse espaçamento entre as células cardíacas foram maiores nos ratos tratados com testosterona e cocaína, ficando evidente que a associação dessas duas substâncias pode aumentar a ocorrência de efeitos adversos no coração (TOGNA et al., 2003).

O coração possui um sistema especializado que gera e propaga estímulos elétricos de maneira rítmica e espontânea. Essa propriedade faz com que as células cardíacas propaguem sinais elétricos ao longo do coração, fazendo com que esse órgão funcione de forma ordenada e rítmica. Essa sincronia durante a contração permite o efetivo bombeamento de sangue para o restante do organismo e, caso isso não ocorra, parte do órgão se contrai antes da outra, o que prejudica a função de bombeamento do coração (GUYTON and HALL, 2006). Dessa maneira, o espaçamento dos miócitos

encontrado em nosso estudo poderia comprometer a transmissão de sinal elétrico ao longo do coração, podendo levar a um comprometimento do bombeamento cardíaco e possível acúmulo de sangue nas câmaras cardíacas, como também observado em nosso estudo.

Além desse espaçamento, nossa análise histológica também indicou a presença de vasos dilatados em animais tratados com cocaína, além de ter sido encontrada em maiores quantidades em animais tratados com testosterona e cocaína. Essa vasodilatação pode ser em decorrência da necessidade de uma maior demanda de oxigênio e nutrientes pelas células cardíacas comprometidas. No mesmo sentido, Lange et al. (2001), relataram a presença multifatorial de cardiopatologias associadas à administração de cocaína, incluindo vasodilatação do coração.

A administração de testosterona tem sido associada à hipertrofia cardíaca, principalmente de ventrículo esquerdo (SCHAIBLE et al., 1984; SCHEUER et al., 1987; MALHOTRA et al., 1990; MARSH et al., 1998; HASSAN et al., 2009). Assim, também avaliamos se o tratamento repetido de testosterona poderia causar hipertrofia cardíaca.

Observamos aumento da espessura do átrio esquerdo em ratos adultos tratados com “testosterona-salina” e “testosterona-cocaína” e no átrio direito nos mesmos ratos adultos tratados com “testosterona-cocaína”. Quanto aos ventrículos, nossos resultados não demonstraram aumento de espessura. Outros resultados demonstraram o aparecimento de hipertrofia de ventrículo esquerdo quando EAAs foram administrados repetidamente (MARSH et al., 1998; THUM and BORLAK, 2002; HASSAN et al., 2009). Entretanto, esses

resultados podem ser em decorrência do maior período de tratamento e o uso de EAAs que podem permanecer de seis a oito semanas no organismo.

É interessante ressaltar que nosso estudo demonstrou o desenvolvimento de um fenômeno que nem sempre é observado – a hipertrofia de átrios. Esse fenômeno pode estar relacionado com o aumento de PAM, PAS e PAD encontrado em nosso estudo, mas seus mecanismos ainda não são totalmente entendidos. Pode ser que esse achado ocorra em decorrência da testosterona também atuar na estimulação temporária da contratilidade atrial através de um mecanismo direto nos sistemas de contração cardíaca (GIMENO et al., 1963).

Nosso estudo também investigou as alterações de enzimas indicadoras de danos hepáticos nos mesmos animais tratados repetidamente com testosterona e cocaína. Nossos resultados demonstraram que animais adultos e adolescentes tratados repetidamente com testosterona e cocaína não apresentaram alterações nas enzimas que indicam danos hepáticos (ALT, AST e fosfatase alcalina). Esses resultados são coerentes com os encontrados nas nossas análises patológicas.

Contudo, nossos resultados das enzimas hepáticas possam ser em decorrência de termos utilizado testosterona, que é metabolizada rapidamente pelo fígado. Nesse sentido, Welder et al. (1995) e Evans (2004) demonstraram que EAAs alquilados são mais tóxicos aos hepatócitos quando comparados aos não alquilados (como a testosterona), demonstrando alterações nos níveis de ALT e AST.

Nossos resultados também não indicaram alterações na enzima que indica danos cardíacos em ratos adolescentes. Contudo, no caso de ratos adultos houve uma tendência ($p < 0,06$) para o grupo que foi tratado repetidamente com testosterona e cocaína. Mais uma vez, esse resultado pode ter sido influenciado pelo fato de termos realizado um tratamento crônico, já que a CK-MB é uma enzima que alcança seu pico 24 horas após o dano cardíaco e retorna aos níveis normais após 2 ou 3 dias (INFOTEC, Labtest). Dessa maneira, pode ser que não observamos alterações nos níveis de CK-MB em decorrência de terem ocorrido possíveis danos cardíacos ao longo do tratamento repetido com testosterona e cocaína, sem ser possível sua detecção pelo método utilizado.

Resumindo, em relação aos níveis de ALT, AST e fosfatase alcalina, não foram observadas alterações nos níveis dessas enzimas nem em ratos adultos e nem em ratos adolescentes. Esses resultados são coerentes com as análises histopatológicas, que também não indicaram alterações morfológicas e celulares. Nosso estudo também demonstrou que o tratamento repetido com administrações combinadas de testosterona e cocaína durante 10 dias, apresentaram alterações no PAM, PAS e PAD de ratos adultos acompanhada de alterações histopatológicas, mas sem alterações na CK-MB. Também observamos que ratos adolescentes apresentaram respostas distintas na FC frente diferentes tratamentos utilizados, sendo também diferentes quando comparados aos adultos, indicando uma evidente distinção de mecanismos responsáveis pelo controle cardiovascular. Esses animais também apresentaram alterações histopatológicas, mas sem alterações na CK-MB.

Dessa maneira, é possível sugerir uma possível interação entre testosterona e cocaína com ações no sistema nervoso central, podendo levar à neuroadaptações e conseqüente desenvolvimento da dependência, e com ações periféricas, sendo o sistema cardiovascular o mais acometido por tal interação.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BENZAQUEN, B.S.; COHEN, V.; EISENBERG, M.J. Effects of cocaine on the coronary arteries. **Am Heart J.**, v. 142, p. 402-410, 2001.
- BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 93, p.43–48, 2005.
- BIRGNER, C.; KINDLUNDH-HOGBERG, A.M.S.; ALSIO, J.; LINDBLOM, J.; SCHIOTH, H.B.; BERGSTROM, L. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate affects mRNA expression of dopaminergic but not serotonergic receptors. **Brain Research.**, v. 1240, p. 221-228, 2008.
- CADONI, C.; PISANU, A.; SOLINAS, M.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Behavioral sensitization after exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. **Psychopharmacology**, v.158, p.259-266, 2001.
- CEBRID (CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS).Disponível em <http://200.144.91.102/cebridweb/default.aspx>. Acesso em 25 de janeiro de 2010.
- CHEN, K.; KANDEL, D.B. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. **Am J Public Health.**, v.85, p. 41-47, 1995.
- CHIN, J.; STERNIN, O.; WU, H.B.K.; BURREL, S.; LU, D.; JENAB, S.; PERROTI, L.I.; QUIÑONES-JENAB, V. Endogenous gonadal hormones modulate behavioral and neurochemical responses to acute and chronic cocaine administration. **Brain Research.**, v. 945, p. 123-130, 2002.
- COLLINS, S.L.; IZENWASSER, S. Chronic nicotine differentially alters cocaine induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. **Neuropharmacology.**, v.46, p.349-362, 2004.

- CRUZ, F. C.; De LUCIA, R.; PLANETA, C. S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, p. 411-417, 2005.
- CUNNINGHAM, S.T.; KELLEY, A.E. Evidence for opiate-dopamine cross sensitization in nucleus accumbens: Studies of conditioned reward. **Brain Research Bulletin**,v. 29, p. 675-680, 1992.
- D'ANDREA, A.; CASO, P.; SALERNO, G.; SCARAFILE, R.; DE CORATO, G.; MITA, C.; DI SALVO, G.; SEVERINO, S.; CUOMO, S.; LICCARDO, B.; ESPOSITO, N.; CALABRO, R. Left ventricular early myocardial dysfunction after chronic misuse of anabolic androgenic steroids: a Doppler myocardial and strain imaging analysis. **Br J Sports Med.**, v. 41, p. 149-155, 2007.
- DAWSON, R. Drugs in sport – the role of the physician. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 55-61, 2001.
- DECK, C.C.; RAYA, T.E.;GABALLA, M.A. Baroreflex control of heart rate in rats with heart failure after myocardial infarction: effects of captopril. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 263, p. 1424–1431, 1992.
- DURANT, R.H.; RICKERT, V.I.; ASCHWORTH, C.S.; NEWMAN, C.;SLAVENS, G. Use of multiple drugs among adolescents who use anabolic steroids. **N. Eng. Journal Medicine.**, v. 328, p. 922-926, 1993.
- ENGI, S.A.; CRUZ, F.C.; LEÃO, R.M.; CORRÊA, F.M.; PLANETA, C.S.; CRESTANI, C.C. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 59, p. 231-240, 2012.
- EVANS, M.A.; HARBISON, R.D. Cocaine-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 45, p. 739-754, 1978.
- EVANS, N.A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The Am. Jour. Sports Med.**, v. 32, p. 534-542, 2004.
- FRIEDL, K.E. Effect of anabolic steroids on physical health. In: Yesalis, C.E. (Ed.), **Anabolic Steroids in Sport an Exercise**, 2ªEd., Human Kinects,

Champaign, p. 175-225, 2000.

GIMENO, A. L.; GIMENO, M. F.; LEYDEN, W.J. Action of sex steroids on the electrical and mechanical properties of rat atrium. **Am. J. Physiol.**, v. 205, p. 198-200, 1963.

GLAZER, G. Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels – a literature review. **Arch Intern Med.**, v. 151, p. 1925-1933, 1991.

GORLICK, D.L.; KELLEY, D.B. The ontogeny of androgen receptors in the CNS of *Xenopus laevis* frogs. **Brain Res.**, v. 391, p. 193–200, 1986.

GRASSI, G.; TREVANO, F.Q.; SERAVALLE, G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 48, p. 407–415, 2006.

GREA (GRUPO INTERDISCIPLINAR DE ÁLCOOL E DROGAS). Disponível em <http://www.grea.org.br/>. Acesso em 25 de janeiro de 2010.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; MERZ, C.N.; BREWER JR, H.B.; CLARK, L.T.; HUNNINGHAKE, D.B.; PASTERNAK, R.C.; SMITH JR, S.C.; STONE, N.J. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. **Circulation**, v. 110, p. 227-239, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Heart Muscle; The Heart as a Pump and Function of the Heart Valves. In: **Textbook of Medical Physiology**. 11ªEd. Elsevier, p. 103-122, 2006.

HASSAN, A.; CSEMY, L.; RAPPO, M.A.; KNIGHT, J.R. Adolescent substance abuse around the world: an international perspective. **Adolesc Med State Art Ver.**, v. 20, p. 915-929, 2009.

HASSAN, N.A. Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. **Human & Exp. Tox.**, v. 28, p. 273-283, 2009.

HEMMINGS, H.C. JR.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of

DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1. **J Biol Chem.**, v. 259(23), p. 14491-7, 1984.

HENNINGFIELD, J.E.; RADZIUS A; COOPER T M; CLAYTON R. R. Drinking coffee and carbonated beverages blocks absorption of nicotine from nicotine polacrilex gum. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v.264, p.1560-1564,1990.

ISNER, J.M.; ESTES, N.A.; THOMPSON, P.D. Acute cardiac events temporally related to cocaine abuse. **N Engl J Med.**, v. 315, p. 1438–1443, 1986.

JOHANSON, P.; LINDQVIST, A.; NYBERGA, F.; FAHLKEB, C. Anabolic androgenic steroids affects alcohol intake, defensive behaviors and brain opioid peptides in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 271- 279, 2000.

JOHANSON, P.; RAY, A.; ZHOU, Q.; HUANG, W.; KARLSSON, K.; NYBERG, F. Anabolic androgenic steroids increase b-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain. **Neuroscience Research**, v. 27, p. 185–189, 1997.

KAILANTO, S.; KANKAANPÄÄ, A.; SEPPÄLÄ, T. Subchronic steroid administration induces long lasting changes in neurochemical and behavioral response to cocaine in rats. **Steroids.**, v. 76, p. 1310–1316, 2011.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of a10 dopamine neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 241, p. 204-212, 1987.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I.; POPE JR, H.G. Illicit anabolic-androgenic steroid use. **Hormones and Behavior**, (Epub ahead of print), 2009.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I.; POPE JR, H.G. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: a looming public health concern?. **Drug Alcohol Dependence**, v. 98, p.1-12, 2008.

- KLONER, R.A.; HALE, S.; ALKER, K. The effects of acute and chronic cocaine use on the heart. **Circulation.**, v. 85, p. 407–419, 1992.
- KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v.24, p.97-129, 2001.
- KRIEG, A.; SCHARHAG, J.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W.; URHAUSSEN, A. cardiac tissue Doppler in steroid users. **International Journal of Sports Medicine**, v. 28, p.638-643, 2007.
- KUMAI, T.; TANAKA, M.; WATANABE, M. Possible involvement of androgen in increased norepinephrine synthesis in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. **Jpn J Pharmacol.**, v. 66, p. 439–444, 1994.
- LANGE, R.A.; HILLIS, L.D. Cardiovascular complications of cocaine use. **N Engl J Med.**, v. 345, p. 351-358, 2001.
- LARA, H.; GALLEGUILLOS, X.; ARRAU, J. Effect of castration and testosterone on norepinephrine storage and on the release of [(3)H] norepinephrine from rat vas deferens. **Neurochem Int.** v. 7, p. 667–674, 1985.
- LECCA, D.; VALENTINI, V.; CACCIAPAGLIA, F.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on in vivo nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 103-116, 2007.
- LENDERS, J.W.; DEMACKER, P.N.; VOS, J.A.; JANSEN, P.L.; HOITSMA, A.J.; VAN'T LAAR, A.; THIEN, T. Deleterious effects of anabolic steroids on serum lipoproteins, blood pressure, and liver function in amateur body builders. **International Journal of Sports Medicine**, v. 9, p.19-23, 1988.
- LENOIR, M.; SERRE ,F.; CANTIN, L.; AHMED, S.H. Intense Sweetness Surpasses Cocaine Reward. **Plos one.**, v. 8, p.698, 2007.
- LINDSAY G. B.; RAINEY, J. Psychosocial and Pharmacologic Explanations of Nicotine Is ⁴⁴ Gateway Drug' Function. **Journal of School Health**, v. 67, n. 4, 1997.

- LISE, M.L.Z.; DA GAMA E SILVA, T.S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, p. 364-70, 1999.
- LONG, S.F.; DENNIS, L.A.; RUSSELL, R.K.; BENSON, K.A.; WILSON, M.C. Testosterone implantation reduces the motor effects of cocaine. **Behav Pharmacol**, v.5, p.103-106, 1994.
- MALHOTRA, A.; BUTTRICK, P.; SCHEUNER, J. Effects of sex hormones on development of physiological and pathological hipertrophy in male and female rats. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 866-871, 1990.
- MARAJ, S.; FIGUEREDO, V.M.; LYNN, MORRIS D. Cocaine and the heart. **Clin Cardiol.**, v. 33, p. 264–269, 2010.
- MARIN, M.T.; PLANETA, C.S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent but not adult rats. **Brain Research.**, v. 1013, p.83-90, 2004.
- MARSH, J.D.; LEHMANN, M.H.; RITCHIE, R.H.; GWATHMEY, J.K.; GREEN, G.E.; SCHIEBINGER, R.J. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation.**, v. 98, p. 256-261, 1998.
- MARTINES-SANCHIS, S.; BRAIN, P.F.; SALVADOR, A.; SIMON, V.M. Long term chronic treatment with stanozolol lacks significant effects on aggression and activity in young and adult male laboratory mice. **General Pharmacology**, v.27, p.293-298, 1996.
- MENENDEZ-DELMESTRE, R.; SEGARRA, A.C. Testosterone is essential for cocaine sensitization in male rats. **Physiol Behav.**, v.102, p. 96-104, 2010.
- MINERLY, A.C.E.; WU, H.B.K.; WEIERTALL, K.M.; NIYOMCHAI, T.; KEMEN, L.; JENAB, S.; QUINONES-JENAB, V. Testosterone differentially alters cocaine -induced ambulatory and rearing behavioral responses in adult and adolescent rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.94, p. 404 409, 2010.

- MICHELS, G.; ER, F.; EICKS, M. Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. **Endocrinology**, v. 147, p. 5160–5169, 2006.
- MISERENDINO, M.J.; NESTLER, E.J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 674, p.299-306, 1995.
- NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Web Report 2004. Disponível em www.drugabuse.gov. Acesso em 25 de janeiro de 2010.
- NESTLER, E.J.; AGHAJANIAN, G.K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.
- NESTLER, E. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Rev Neurosc.**, v.02, p. 119-128, 1995.
- NDIKUM-MOFFOR, F.M.; ROBERTS, S.M. Cocaine-protein targets in mouse liver. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 105-113, 2003.
- PAXINOS, G.; KUS, L.; ASHWELL, K.W.S.; WATSON, C. Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain. Academic Press, 1ª Ed., 1999.
- PHILLIS, B.D.; IRVINE, R.J.; KENNEDY, J.A. Combined cardiac effects of cocaine and the anabolic steroid, nandrolone, in the rat. **Eur J Pharmacol.**,v. 398, p. 263–272, 2000.
- PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev.**, v.25, p.192-216, 1997.
- POPE, H.G.; BROWER, K.J. Anabolic-androgenic steroid-related disorders, In: Sadock, B., Sadock, V. (Eds), **Comprehensive Textbook of Psychiatry**, 9ª Ed.Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, PA, p. 1419-1431, 2009.
- PONTIERE, F.E.; TANDA, G.; ORZI, F.; DI CHIARA, G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**, v.382, p.255-257, 1995.

- QUIÑONES-JENAB, V.; PERROTTI, L.I.; FABIAN, O.J.; CHIN, J.; RUSSO, S.J.; JENAB, S. Endocrinological Basis of Sex Differences in Cocaine-Induced Behavioral Responses. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 937, p. 140-171, 2001.
- RAHMAN, S.; ZHANG, J.; ENGLEMAN, E.A.; CORRIGALL, W.A. Neuroadaptive changes in the mesoaccumbens dopamine system after chronic nicotine self-administration: a microdialysis study. **Neuroscience**, v. 129, p. 415-424, 2004.
- REBOUSSIN, B.A.; ANTHONY, J.C. Is there epidemiological evidence to support the idea that a cocaine dependence syndrome emerges soon after onset of cocaine use? **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 2055-2064, 2006.
- ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res Rev.** v. 396, p.157-198, 1986.
- ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, p. 103-114, 2001.
- ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain. Res. Rev.**, v.18, p.247-291, 1993.
- ROTHMAN, R.B.; BAUMANN, M.H. Balance between dopamine and serotonin release modulates behavioral effects of amphetamine-type drugs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1074, p. 245-260, 2006.
- SANCHES-OSORIO, M.; DUARTE-ROJO, A.; MARTINEZ-BENITEZ, B.; TORRE, A.; URIBE, M. Anabolic-androgenic steroids and liver injury. **Liver Inter.**, p. 278-282, 2007.
- SANTOS, G. C.; MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. **Addiction Biology**, v. 14, p. 270-275, 2009.

- SCHAIBLE, T.F. MALHOTRA, A.; CIAMBRONE, G.; SCHEUER, J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. **Circ. Res.**, v. 54, p. 38-49, 1984.
- SCHEUER, J.M.A.; SCHAIABLE, T.; CAPASSO, J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. **Circ. Res.**, v. 61, p. 12-19, 1987.
- SNYDER, P.J. Androgens. In: Hardman Limbird, J.G.L.E., Goodman Gilman, (Eds), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10^aEd. McGraw Hill, New York, p. 1635-1648, 2001.
- SPEAR, L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. **Alcohol Res. & Health**, v. 24, p. 115-123, 2000.
- SULLIVAN, M.L.; MARTINEZ, C.M.; GENNIS, P. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 41, p. 1–15, 1998.
- TOGNA, G.I.; TOGNA, A.R.; GRAZIANI, M.; FRANCONI, M. Testosterone and cocaine: vascular toxicity of their concomitant abuse. **Thrombosis Research**, v.109, p. 195-201, 2003.
- THE ICD 10 CLASSIFICATION OF MENTAL AND BEHAVIORAL DISORDERS, DIAGNOSTIC CRITERIA FOR RESEARCH (CID 10). Geneva World Health Organization, 2007.
- THIBLIN, I.; FINN, A.; ROSS, S.B.; STENFORS, C. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. **Brit Jour of Pharmacol.**, v.126, p. 1301-1306, 1999.
- TRIAMSTRA, J.L.; SATO, S.M.; WOOD, R.I. Testosterone and nucleus accumbens dopamine in the male Syrian hamster. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 383-394, 2007.
- TSENG, Y.T.; ROCKHOLD, R.W.; HOSKINS, B. Cardiovascular toxicities of nandrolone and cocaine in spontaneously hypertensive rats. **Fundam Appl Toxicol.**, v. 22, p. 113–121, 1994.

UNODC (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME). World Drug Report, 2009. Disponível em www.unodc.org. Acesso em 25 de janeiro de 2010.

VAN AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, A.; HARTGENS, F. Adverse health effects of anabolic-androgenic steroids. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 57, p. 117–123, 2010.

WEINER, R.B.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J.I.; HUTTER, A.M.; PICARD, M.H.; POPE, H.G.; BAGGISH, A.L. Chronic anabolic-androgenic steroid use is associated with left ventricular systolic and diastolic dysfunction (Abstract). **Circulation**, (Epub ahead of print), 2009.

WISE, R.A.; BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.**, v.94, p.469-92, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Statistical classification of diseases and related health problems. Geneve: **WHO**, 2002.