

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



**Avaliação citotóxica de formulações de esteroides anabolizantes apreendidas
pela Polícia Federal em cultivo primário de astrócitos**

Gabriela Tolfo Guerra

Pelotas, 2022

Gabriela Tolfo Guerra

**Avaliação citotóxica de formulações de esteroides anabolizantes apreendidas
pela Polícia Federal em cultivo primário de astrócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dra. Roselia Maria Spanevello
Co-orientadora: Dra. Mayara Sandrielly Pereira de Aguiar

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G934a Guerra, Gabriela Tolfo

Avaliação citotóxica de formulações de esteroides anabolizantes apreendidas pela Polícia Federal em cultivo primário de astrócitos / Gabriela Tolfo Guerra ; Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Mayara Sandrielly Pereira de Aguiar, coorientadora. — Pelotas, 2022.

70 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Esteroides anabolizantes androgênicos. 2. Decanoato de nandrolona. 3. Astrócitos. 4. Estresse oxidativo. 5. Radical livre. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Aguiar, Mayara Sandrielly Pereira de, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Gabriela Tolfo Guerra

**Avaliação citotóxica de formulações de esteroides anabolizantes apreendidas
pela Polícia Federal em cultivo primário de astrócitos**

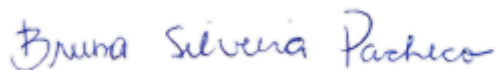
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 2 de março de 2022

Banca examinadora:



Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello (Orientadora) - Doutora em Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Dr^a Bruna Silveira Pacheco - Doutora em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.



Prof^a Dr^a Jucimara Baldissarelli - Doutora em Bioquímica Toxicológica - Universidade Federal de Santa Maria.

Dedico

Dedico este trabalho a minha mãe Maristela e ao meu pai Luis Augusto por terem me concedido a oportunidade de chegar até aqui.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus familiares, em especial aos meus pais Maristela e Luis Augusto que sempre me apoiaram em todas minhas decisões e durante toda essa trajetória. As minhas irmãs Letícia e Marina que durante todo esse tempo foram essenciais para minha formação acadêmica e pessoal. Ao meu irmão Eduardo que com certeza é um dos meus motivos de sempre seguir em frente e correndo atrás dos meus objetivos. Muito obrigada por tudo que fizeram por mim durante esse tempo!

Gostaria de agradecer também ao meu namorado Thomas por todo apoio, compreensão, carinho e incentivo durante essa etapa.

Agradeço a minha orientadora Roselia por todo incentivo, apoio e dedicação para a elaboração desse trabalho, obrigada por sempre ser essa pessoa incrível!

Agradeço por durante esse trabalho ter recebido a ajuda de pessoas tão especiais, como minha coorientadora Mayara, que sempre esteve disposta para tirar minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse necessário. Os colegas do NEUROCAN, Natalia Bona, Nathalia Pedra, Bernardo, Fernando e todos os outros que me ensinaram tanto, obrigada por toda ajuda, companheirismo, bom humor e apoio durante essa trajetória.

Ao Lucas que sempre esteve disposto a me auxiliar no que eu precisei durante este trabalho e me ajudou muito durante esse tempo.

Também não posso deixar de agradecer a Universidade Federal de Pelotas que me proporcionou essa formação, serei eternamente grata por tanto aprendizado. Quero agradecer também a Polícia Federal e ao Perito Alexandre Machado que cederam as amostras utilizadas nessa pesquisa, possibilitando o andamento desse projeto e os resultados obtidos.

Ao PPGBBio pela oportunidade de realizar este trabalho.

A banca por ter aceitado o convite para a avaliação deste trabalho e ao CNPq pela bolsa concedida.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”
(Marie Curie)

Resumo

GUERRA, Gabriela Tolfo. Avaliação citotóxica de formulações de esteroides anabolizantes apreendidas pela Polícia Federal em cultivo primário de astrócitos. 2022. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciência Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

Esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) são substâncias sintéticas derivadas da testosterona. Devido aos efeitos adversos causados pelos EAAs a sua utilização acontece de forma controlada ou até mesmo proibida. No entanto, o uso ilícito destes tem aumentado ainda mais o risco de efeitos deletérios graves. Os EAAs apresentam ações neurotóxicas, no entanto, seus efeitos em astrócitos ainda são pouco compreendidos. Dessa forma, devido à importância dos astrócitos para a homeostase cerebral a investigação dos efeitos dos EAAs sobre essas células torna-se relevante. Assim, o objetivo do trabalho foi realizar a análise química de EAAs apreendidos pela Polícia Federal e avaliar a citotoxicidade destes compostos em cultura de astrócitos. Foram utilizadas 5 formulações de EAAs apreendidas pela Polícia Federal (denominadas de compostos C1, C2, C3, C4 e C5) e a forma comercial de decanoato de nandrolona como controle padrão. A análise do princípio ativo nas amostras foi identificada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Para a análise citotóxica, culturas de astrócitos corticais de ratos *Wistar* neonatos foram expostas ao decanoato de nandrolona e aos compostos C1 - C5 nas concentrações de 10, 30 e 100 μM durante 48 e 72 h. Após, testes de viabilidade e proliferação celular, níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), conteúdo tiólico total (SH), níveis de nitritos e atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram determinados. Três das amostras de EAAs apresentaram composição diferente da indicada no rótulo. C1 e C2 não tinham rótulo, mas o decanoato de nandrolona foi identificado em ambas. No C3 o rótulo indicava a presença de undecilenato de boldenona porém foi identificado o decanoato de nandrolona na formulação. No C4, o rótulo indicava o propionato de testosterona, mas os compostos identificados foram decanoato de nandrolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona. O C5 tinha decanoato de nandrolona no rótulo, mas esse composto não foi identificado por CG-EM. Em relação aos efeitos citotóxicos o decanoato de nandrolona e C1 aumentaram a proliferação celular na concentração de 10 μM enquanto C3 e C4 na de 100 μM ($P < 0,05$). C1 e C2, C4, C5 e decanoato de nandrolona (10 μM) e C3 (100 μM) aumentaram a viabilidade celular. Por outro lado, foi observado uma redução na viabilidade celular nas maiores concentrações avaliadas ($P < 0,05$). Um aumento de ROS foi observado com decanoato de nandrolona, C1, C4, C2 e C5 enquanto um aumento nos nitritos ocorreu com decanoato de nandrolona, C3 e C4 na maior concentração testada. Os níveis de SH foram reduzidos quando os astrócitos foram expostos ao decanoato de nandrolona, C1, C2 e C5 ($P < 0,05$). Por fim, a atividade da CAT foi reduzida pelo decanoato de nandrolona e C1, C2 e C5 e a SOD por C2 e C5 ($P < 0,05$). Os EAAs apreendidos alteraram a viabilidade e proliferação celular além de causar dano oxidativo em astrócitos. Esses achados demonstram o potencial gliotóxico dos EAAs além de evidenciar que as formulações apreendidas podem ser perigosas para a saúde dos usuários, devida sua composição ser incerta e não possuir o controle de qualidade correto para sua produção.

Palavras-chave: Esteroides anabolizantes androgênicos, decanoato de nandrolona, astrócitos, estresse oxidativo, radical livre

Abstract

GUERRA, Gabriela Tolfo. Cytotoxic evaluation of anabolic steroid formulations applied by the Federal Police in primary astrocytes culture. 2022. 70 f. Dissertation (Master) – Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical Science, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, 2022.

Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic substances derived from testosterone. Due to the side effects caused by AAS, their use is controlled or even prohibited. However, their illicit use has further increased the risk of serious deleterious effects. AAS have neurotoxic actions, however, their effects on astrocytes are still poorly understood. Thus, due to the importance of astrocytes for brain homeostasis, the investigation of the effects of AAS on these cells becomes relevant. Thus, the objective of this work was to perform the chemical analysis of AAS seized by the Federal Police and to evaluate the cytotoxicity of these compounds in astrocyte culture. Five formulations of AAS learned by the Federal Police were used (called compounds C1, C2, C3, C4 and C5) and the commercial form of nandrolone decanoate as standard control. The analysis of the active ingredient in the samples was performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For cytotoxic analysis, cultures of cortical astrocytes from neonatal Wistar rats were exposed to nandrolone decanoate and to compounds C1 – C5 at concentrations of 10, 30 and 100 μM for 48 and 72 h. Afterwards, cell viability and proliferation tests, and the levels of reactive oxygen species (ROS), total thiol content (SH), nitrite levels and activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were determined. Three samples had a different composition than indicated on the label. C1 and C2 were unlabeled, but nandrolone decanoate was identified in both. In C3, the label indicated the presence of boldenone undecylenate, but nandrolone decanoate was identified in the formulation. At C4, the label indicated Testosterone Propionate, but the compounds identified were Nandrolone Decanoate, Testosterone Propionate, and Testosterone Cypionate. C5 had nandrolone decanoate on the label, but this compound was not identified by GC-MS. Regarding the cytotoxic effects, nandrolone decanoate and C1 increased cell proliferation at a concentration of 10 μM while C3 and C4 at 100 μM ($P < 0.05$). C1 and C2, C4, C5 and nandrolone decanoate (10 μM) and C3 (100 μM) increased cell viability. On the other hand, a reduction in cell viability was observed at the highest concentrations evaluated ($P < 0.05$). An increase in ROS was observed with nandrolone decanoate, C1, C4, C2 and C5 while an increase in nitrites occurred with nandrolone decanoate, C3 and C4 at the highest concentration tested. SH levels were reduced when astrocytes were exposed to nandrolone decanoate, C1, C2 and C5 ($P < 0.05$). Finally, CAT activity was reduced by nandrolone decanoate and C1, C2 and C5 and SOD by C2 and C5 ($P < 0.05$). The apprehended AAS alter cell viability and proliferation in addition to causing oxidative damage in astrocytes. These findings demonstrate the gliotoxic potential of AAS in addition to showing that the seized formulations can be dangerous to the health of users, due to their composition being uncertain and not having the correct quality control for their production.

Key words: Androgenic anabolic steroids, nandrolone decanoate, astrocytes, oxidative stress, free radical.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classes dos esteroides anabolizantes androgênicos e exemplos	17
Tabela 2. Efeitos adversos causados pelo consumo inadequado de agentes anabólicos	21

Lista de Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
DHT	Diidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAA	Esteroides Anabolizantes Androgênicos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
NF- κB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-Aspartato
PF	Polícia Federal
RA	Receptor andrógeno
RE	Receptor estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Revisão de literatura.....	16
3.1 Esteroides Anabolizantes Androgênicos (EAAs)	16
3.2 Mecanismo de ação	18
3.3 Uso abusivo de EAAs e os efeitos tóxicos	19
3.4 Decanoato de nandrolona	22
3.5 Estresse oxidativo	23
3.6 Astrócitos.....	25
4 Resultados	27
4.1 Manuscrito	28
5 Discussão.....	59
6 Conclusão	63
7 Referências	64
8 Anexos	71

1. Introdução

Esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) representam uma categoria de derivados sintéticos da testosterona. Inicialmente, na década de 1940, esses compostos eram utilizados para reabilitação de queimaduras, traumas e cirurgias. Posteriormente passaram a ser utilizados no tratamento de hipogonadismo e osteoporose. Contudo, os EAAs começaram a ser utilizados de forma ilícita por atletas recreativos e profissionais com o objetivo de melhorar o desempenho atlético e aumentar a massa muscular (SILVERTHON, 2019; WEBER et al., 2017).

O uso ilícito dos EAAs está relacionado a efeitos adversos causados por eles, principalmente quando consumido de forma supra fisiológica. O consumo excessivo pode causar danos físicos, no sistema cardiovascular, além de tumores no fígado, entre outras consequências (HULLSTEIN et al., 2015). Esse risco causado pelo consumo dessas substâncias levou diversos países a controlarem ou proibirem o uso dos anabolizantes entre a população (WEBER et al., 2017). No Brasil, de acordo com a Legislação, o uso de anabolizantes sem fins terapêuticos é proibido; sendo que estes só podem ser vendidos em farmácias e drogarias com retenção da receita médica (BERNEIRA et al., 2019). Devido a esse controle pelos órgãos de fiscalização em relação ao uso e a venda dos EAAs a comercialização destas substâncias de forma ilícita tem aumentado muito o que tem refletido em um maior número de apreensões pela Polícia Federal. Entre os anos de 2008 a 2011 ocorreu um aumento de 200% nas apreensões realizadas pela Polícia Federal e junto com o aumento de apreensões temos o aumento das falsificações dessas formulações, o que pode aumentar o dano causado ao consumidor, já que esses produtos não possuem garantia de controle de qualidade e muitas vezes, nem condições sanitárias adequadas para a sua produção (NEVES; MARCHETTI; CALDAS, 2013; NEVES et al., 2016).

Diversos órgãos são alvos de ação dos EAAs, por isso os seus efeitos negativos podem ser vistos nos sistemas reprodutivo, renal, hematológico entre outros (ALBANO et al., 2021). Ademais, já foi relatado os efeitos neuropsiquiátricos e comportamentais associados ao uso indiscriminado dos EAAs. Estudos demonstraram que a administração de agentes anabólicos a longo prazo em roedores induz alterações comportamentais e neuroquímicas que se assemelham a modificações comportamentais de indivíduos que fazem o uso abusivo de EAAs

(HALL; HALL; CHAMPMAN, 2005; CLARK; HENDERSON, 2003; HENDERSON et al., 2006). Além disso, estudos experimentais realizados com o decanoato de nandrolona, um dos EAAs mais utilizados mundialmente, demonstram que este composto induz dano oxidativo em diferentes regiões cerebrais como hipocampo, estriado e córtex pré-frontal (TURILLAZZI et al., 2016; ZELLEROTH et al., 2019). Embora os mecanismos exatos associados ao efeito neurotóxico dos EAAs ainda permaneçam pouco elucidados, dados da literatura convergem para a afirmação que o uso abusivo destes podem afetar importantes vias de sinalização cerebral (TURILLAZZI et al., 2016; ZELLEROTH et al., 2019; BUSARDÒ et al., 2015)

Os astrócitos são as células mais abundantes do sistema nervoso central (SNC) e possuem papéis fisiológicos cruciais para a manutenção da função cerebral. Essas células atuam no desenvolvimento e função das sinapses, regulam o fluxo sanguíneo cerebral e possuem um papel importante relacionado ao metabolismo energético no SNC (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Além de manter as atividades cerebrais normais, os astrócitos também respondem a diversos insultos ou lesões no SNC. Assim, quando isso ocorre são observadas alterações na expressão gênica, morfologia, capacidade proliferativa e função dos astrócitos que são coletivamente referidas como astrogliose reativa. Os astrócitos reativos podem acabar liberando de forma exacerbada diversos fatores inflamatórios que incluem citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio as quais são citotóxicas contribuindo assim para o dano cerebral (SOFRONIEW, 2015). Entretanto, dados da literatura avaliando os efeitos dos EAAs em astrócitos ainda são escassos.

Neste contexto, considerando o uso abusivo dos EAAs e o impacto na saúde dos usuários causado por eles, especialmente de formulações adulteradas, e a importância dos astrócitos para manutenção da homeostase cerebral, esse estudo tem como objetivo avaliar a composição química de formulações de EAAs apreendidos pela Polícia Federal (PF), bem com o efeito citotóxico de formulações contendo decanoato de nandrolona sobre os status redox *in vitro* em cultivo primário de astrócitos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi realizar a análise química e os efeitos da exposição de esteroides anabolizantes androgênicos apreendidos pela Polícia Federal de Pelotas (RS) em parâmetros de estresse oxidativo em cultura primária de astrócitos.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar as formulações de esteroides anabolizantes androgênicos através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM).
- II. Avaliar os efeitos dos esteroides anabolizantes androgênicos na viabilidade e proliferação celular de astrócitos.
- III. Avaliar marcadores de estresse oxidativo, como níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrito e o conteúdo tiólico total em cultura primária de astrócitos expostas a esteroides anabolizantes androgênicos.
- IV. Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em cultura primária de astrócitos expostas a esteroides anabolizantes androgênicos.

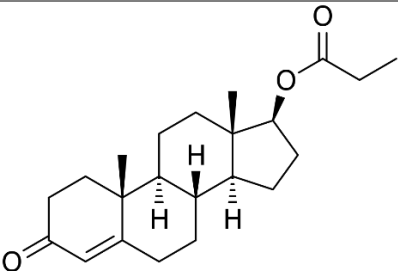
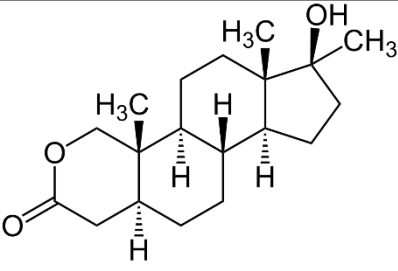
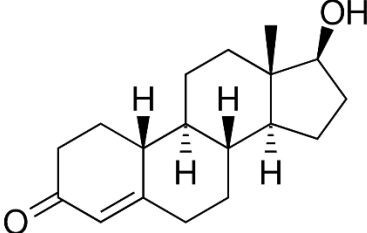
3. Revisão de Literatura

3.1 Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAAs)

Os hormônios esteroides são moléculas endógenas formados a partir do colesterol. Dentre esses hormônios, pode-se incluir os corticoides, os metabólitos ativos da vitamina D, os hormônios produzidos pelas gônadas masculinas como a testosterona e hormônios femininos como o estrogênio e progesterona. Esses hormônios são essenciais para manutenção da homeostase celular e tecidual, sendo, portanto, necessária à sua utilização terapêutica em casos de deficiência ou patologias. Por esta razão, o desenvolvimento de hormônios esteroides sintéticos possuem uma grande relevância. A partir da testosterona foram desenvolvidas moléculas sintéticas, que são chamadas de esteroides anabólicos androgênicos (CUNHA et al., 2004).

Os EAAs também podem causar efeitos tróficos no tecido muscular aumentando a massa e a força muscular (POMARA et al., 2015). Sendo assim, diversas modificações foram realizadas na estrutura da testosterona para aumentar os efeitos anabólicos e diminuir os efeitos androgênicos. Atualmente os EAAs são classificados em 3 grupos principais com base na substituição da molécula base: Classe I – incluem os derivados da testosterona que tem a sua porção hidroxila 17β esterificada (cipionato, undecanoato, enantato e propionato de testosterona); Classe II – são os análogos da testosterona que tem a sua posição 17α alquilada (metandrostenolona, nortandrolona e oxandrolona) e a Classe III – são aqueles derivados da testosterona que possuem modificação química no seu anel A, B ou C (metenolona, nortandrolona, nandrolona e estanozol) (Tabela 1) (PROKUDINA, et al., 2015; EVANS, 2004).

Tabela 1. Classes dos esteroides anabolizantes androgênicos e exemplos.

Classe	Exemplos	Estrutura
I – 17β esterificada	Cipionato de testosterona Propionato de testosterona	 Propionato de testosterona
II – 17α alquilada	Estanozolol Oxandrolona	 Oxandrolona
III - modificação química no seu anel A, B ou C	Decanoato de nandrolona Trembolona	 Decanoato de nandrolona

Fonte: EVANS, 2004.

Embora o efeito anabólico dos EAAs tem sido associado principalmente ao seu uso ilícito esse efeito também tem diversas aplicações terapêuticas tais como em tratamentos contra perda muscular causada por queimaduras graves e algumas doenças crônicas como câncer, cirrose hepática e distrofia muscular. Diversos estudos também demonstraram que o uso de EAAs causam um efeito positivo para recuperação de massa muscular, força e metabolismo ósseo (BAGATELL; BREMNER, 1996; BASARIA; WAHLSTROM; DOBS, 2001; FERRANDO et al., 2001, WRIGHT et al., 2018).

Como comentado anteriormente, os EAAs são derivados sintéticos da testosterona, que tem como objetivo potencializar o efeito anabólico e prolongar a atividade biológica. Entretanto quando comparados a testosterona, que possui uma

razão anabólica/androgênica de 1:1, a oxandrolona por exemplo, um anabolizante que se enquadra na classe II, possui uma razão 13:1 e a nandrolona, um anabolizante da classe III, possui uma razão de 10:1 (EVANS, 2004; KICMAN, 2008). Cabe destacar também que as modificações na estrutura química dos EAAs permitiram a disponibilidade desses compostos de diversas formas, como comprimidos, soluções oleosas e suspensões aquosas (BERNEIRA et al., 2019; EVANS, 2004).

Os EAAs podem ser utilizados através de via intramuscular ou via oral, sendo o consumo pela primeira via associado a um longo tempo de meia-vida, com absorção mais lenta e gradual, já que as soluções injetáveis têm na sua composição óleos vegetais e micro cristais. Já por via oral temos um rápido pico de concentração plasmática em um curto período de tempo. A absorção dos EAAs é influenciada pelo tamanho de sua cadeia, sendo que quanto maior a cadeia de ácidos graxos presente no óleo, mais lenta será sua absorção, influenciando assim a ação no organismo e a farmacocinética do agente anabólico (KICMAN, 2008; EVANS, 2004). Mesmo sendo desenvolvidos para potencializar essa atividade anabólica, os EAAs possuem efeito androgênico que podem resultar em efeitos adversos, principalmente quando consumido de formado abusiva (CUNHA, 2004).

3.2 Mecanismo de ação

A testosterona sofre ação da enzima 5 α -redutase, sendo convertida em diidrotestosterona (DHT), que é um metabólito ativo. A testosterona e DHT têm afinidade e ligam-se aos receptores andrógenos (RA). Outro metabólito que a testosterona pode ser convertida é o estradiol, esse ocorrendo através da aromatase, porém esse se liga a receptores estrógenos (RE). Tanto a testosterona quanto os EAAs possuem caráter lipofílico, atravessando as membranas fisiológicas com facilidade. No ambiente intracelular há formação do complexo hormônio-receptor, ocorrendo uma ligação específica dependendo das características químicas de cada anabolizantes (BUSARDÒ et al., 2015; KICMAN, 2008).

Os receptores androgênicos podem ser encontrados em diversas porções no organismo, em diferentes locais como os ossos, cérebro, rins, fígados e o músculo esquelético. Ao chegar no núcleo celular, o complexo hormônio-receptor se liga ao DNA iniciando diversos processos de transcrição, se ligando principalmente a ações anabólicas e androgênicas (EVANS, 2004; KICMAN, 2008).

No caso do decanoato de nandrolona acredita-se que ele apresenta uma menor proporção de efeitos adversos por ser inativado pela 5 α -redutase resultando na dihidronandrolona, que possui baixa afinidade ao RA (MONDA et al., 2017; PATANÉ et al., 2020).

3.3 Uso abusivo de EAAs e os efeitos tóxicos

Um adulto do sexo masculino produz em média diariamente 7 mg de testosterona através das células de Leydig, porém essa quantidade de testosterona não consegue induzir uma atividade anabólica relacionada ao aumento de massa muscular. Com isso para obter esse resultado, o usuário faz o consumo de 10 a 100 vezes maior que a faixa terapêutica, produzindo assim uma superdosagem no organismo (EVANS, 2004). O uso desses anabolizantes normalmente é feito em ciclos de 4 a 8 semanas fazendo um aumento gradativo da dose, esse método é conhecido como *stacking*. Outro método comumente utilizado é o *plateuning*, no qual o usuário utiliza diversos ciclos de EAAs diferentes para não ocorrer uma tolerância do anabolizante (BARCELOUX; PALMER, 2013).

O consumo de EAAs é variado no mundo, por exemplo o Oriente Médio tem a maior taxa de consumo, com 21,7% dos usuários mundiais seguido pela América do Sul com 4,8%. Entre os usuários, o maior consumo ocorre entre os esportistas recreativos (18,4%) seguido por atletas (13,4%), presidiários (12,4%) e usuários de drogas (8,0%). Mundialmente o consumo entre os homens é 3,3% maior que das mulheres. E em relação a idade dos usuários, os adolescentes são os que mais utilizam EAAs mundialmente (REYES-VALLEJO, 2019; SAGOE et al., 2014)

Tendo em vista os efeitos tóxicos, diversos países optaram por controlar e até proibir o consumo de anabolizantes, já que o seu uso pode causar efeitos adversos com a superdosagem (REBIERE et al., 2016; NEVES et al., 2016). Cada localidade tem sua legislação específica para o consumo de agente anabólicos, e no Brasil esse controle é feito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que incluíram os anabolizantes na Lista C5, como substâncias controladas. Conforme a Lei Federal nº 9.965 de 27 de abril de 2000 a venda em farmácias e drogarias só pode ser feita por meio de receita médica, caso a venda não seja feita dessa forma o local e os responsáveis podem ser penalizados conforme a Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977,

e as punições podem ocorrer por multas, advertências, inutilização do produto, apreensão e até interdição do local da venda (BRASIL, 1988).

Na última década devido a um aumento no consumo ilícito dos EAAs um grande número de apreensões destes compostos por órgãos de fiscalização também tem ocorrido. As falsificações também vêm crescendo a cada ano, cerca de um terço das amostras apreendidas são falsificadas (NEVES; MARCHETTI; CALDAS, 2013). O uso de formulações falsificadas pode causar riscos à saúde ainda maiores já que sua concentração é indefinida, há a possível presença de adulterantes e também o risco de contaminação durante sua preparação (COOPMAN; CORDONNIER, 2012; NEVES; CALDAS, 2017).

Trabalhos prévios da literatura têm demonstrado que as formulações de EAAs podem ser analisadas através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAE) ou Espectroscopia de Infravermelho (COOPMAN; CORDONNIER, 2012; NEVES et al., 2016; MESMER; SATZGER, 1997). Um estudo realizado por Berneira e colaboradores com EAAs apreendidos pela Polícia Federal do Brasil, demonstrou que das oito amostras analisadas, duas apresentaram apenas excipientes, sem o princípio ativo descrito no rótulo. Entre as seis amostras que possuíam o ingrediente ativo, cinco não possuíam a concentração descrita, classificando assim essas amostras como falsificadas (BERNEIRA et al., 2019). É importante ressaltar que já tem sido demonstrado na literatura que a utilização inadequada e de doses elevadas dos EAAs pode desencadear diversos efeitos adversos no organismo (Tabela 2) (EVANS, 2004; KICMAN, 2008) entretanto, pode-se destacar ainda, que outro problema agravante é a falsificação e comercialização destes compostos, uma vez que os mesmos podem potencializar os efeitos tóxicos trazendo sérios riscos à saúde dos usuários (BERNEIRA et al., 2019; NEVES et al., 2016).

Tabela 2. Efeitos adversos causados pelo consumo inadequado de agentes anabólicos.

Alvo	Efeito adverso
Glândulas mamárias	Ginecomastia nos homens e atrofia nas mulheres
Pele	Acne e aumento da oleosidade
Fígado	Adenomas hepatocelulares e tumores
Sistema Reprodutivo	Puberdade precoce e diminuição da espermatogênese
Sistema cardiovascular	Arritmia e infarto do miocárdio
Sistema Nervoso	Agressividade, impulsos destrutivos, irritabilidade, mudanças de humor e psicose

Fonte: KICMAN, 2008.

Os efeitos dos EAAs também têm sido avaliados em relação ao SNC (KICMAN, 2008; DAVEY et al., 2016; MAYER; ROSEN, 1975). Dados da literatura tem demonstrado que doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes causam alterações comportamentais (OBERLANDER; HENDERSON, 2012; KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008) e neurotoxicidade por alterar os níveis de neurotrofinas e aumentar a suscetibilidade neuronal a estímulos apoptóticos (SCACCIANOCE et al., 2013). Além disso, também foi relatado que altas doses de EAAs estão associadas a ansiedade, agressividade, depressão e memória (RAMOS-PRATTS et al., 2013; KOUVELAS et al., 2008; BERTOZZI et al., 2018). Os EAAs são capazes de induzir a fosforilação do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), com o objetivo de ampliar a neurotransmissão excitatória, resultando em um aumento de agressão (QUAGLIO et al., 2009). Relacionado a isso, o córtex orbito frontal pode executar um papel na agressividade e comportamento violento nos usuários que consomem esses agentes anabólicos, já que o consumo de EAAs causa a redução do córtex orbito frontal resultando na falta de controle inibitório (JOKSIMOVIC et al., 2019).

Estudos publicados por Basile e colaboradores mostram que doses supra fisiológicas de metandienona e 17- β - metiltestosterona causam citotoxicidade *in vitro* em células neuronais que pode ocorrer por indução da apoptose (BASILE et al., 2013). Já um estudo realizado por Karimooy mostrou que injeções diárias de estanozolol em

ratos adultos machos durante 28 dias causaram mudanças histopatológicas no hipocampo, causando ativação de células apoptóticas e pré-apoptóticas (KARIMOOY et al., 2019). Doses supra fisiológicas de agentes anabolizantes também prejudicam os efeitos positivos da atividade física na proliferação celular das células hipocampais e sinalização apoptótica (GOMES et al., 2014). Além disso, efeitos neurotóxicos também tem sido documentado em relação ao decanoato de nandrolona (ZELLEROTH et al., 2019) um dos EAAs mais utilizados mundialmente pela população.

3.4 Decanoato de nandrolona

A nandrolona é considerada mundialmente um dos EAAs mais utilizados, ela está classificada no grupo II dos EAAs, também chamado de 19-nortestosterona. Quando comparado com o propionato de testosterona, a nandrolona possui efeitos anabolizantes mais fortes e efeitos androgênicos mais fracos. Acredita-se que a nandrolona possui uma maior proporção de efeitos anabólicos quando comparado a qualquer outros EAAs (KUTSCHER; LUND; PERRY, 2002).

O efeito androgênico da nandrolona ocorre devido ao fato dela sofrer ação da 5α -redutase levando a geração de um metabólito que possui baixa afinidade pelo receptor andrógeno. Essa conversão ocorre em menor concentração nos músculos esqueléticos e cardíacos e em maior escala onde há altas concentrações da 5α -redutase, como os órgãos sexuais. Devido ao fato que os músculos possuem uma menor proporção de 5α -redutase, a nandrolona acaba interagindo com os receptores para esteroides, acarretando em uma resposta anabólica maior (CELOTTI; CESI, 1992).

A nandrolona é classificada com um androgênio não-aromatizável, com isso os efeitos indesejáveis feminilizantes que ocorrem devido a utilização dos anabolizantes em doses supra fisiológicas ou em longos períodos são minimizados, já que há baixa taxa de conversão em estrogênio (KUHN, 2002). Quanto ao uso clínico da nandrolona a mesma pode ser usada em cirurgias, queimaduras, traumas, diversas formas de anemia, doença renal crônica, osteoporose em mulheres após a menopausa e também a radioterapia (LLEWELLYN, 2011).

O consumo de nandrolona não ocorre apenas entre adultos, as propriedades anabólicas do composto e seu efeito no aumento da massa muscular chama atenção também de adolescentes. O musculo esquelético é o tecido alvo primário para os

efeitos anabólicos dos anabolizantes. Esses efeitos são mediados por receptores androgênicos que após a exposição aos anabolizantes são regulados estimulando a produção de ácido ribonucleico (RNA), que por sua vez, irá aumentar a síntese proteica fazendo com que ocorra hipertrofia muscular (KADI et al., 2000).

Embora os efeitos da nandrolona no SNC ainda não sejam esclarecidos, estudos prévios relataram que nandrolona pode causar diversas alterações neurológicas as quais podem levar a quadros de irritabilidade, agressividade, mudanças de humor, ansiedade, medo, estresse e psicose (BUSARDÒ et al., 2015; BASILE et al., 2013). Estudos realizados por Turillazzi e colaboradores demonstraram que a nandrolona administrada por via intramuscular, duas vezes por semana por oito semanas nas doses de 3,75 mg/kg (1,875 mg/kg duas vezes por semana) induziu dano oxidativo em áreas cerebrais específicas de ratos, como no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal. Além disso, os resultados também demonstram uma ligação entre o estresse oxidativo e as vias de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), uma vez que a ativação da via do NF- κ B poderia ser mediado pelos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TURILLAZZI et al., 2016). Assim, esses dados sugerem que um dos possíveis mecanismos associados aos efeitos neurotóxicos da nandrolona seja relacionado ao estresse oxidativo.

3.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio químico que ocorre nas células e tecidos que pode ocorrer por duas maneiras: por um aumento na produção de radicais livres, que são substâncias oxidantes e/ou então por uma diminuição do sistema de defesa antioxidante (MCCORD et al., 1993).

A formação de radicais livres é um processo fisiológico que ocorre durante o metabolismo celular normal, no qual as células dispõem de defesas para combater as ações nocivas do excesso destes radicais (LIEBER, 1997). Entre os radicais livres temos as espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil, ânion superóxido (O_2^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Os radicais livres podem ser tão prejudiciais pelo fato de serem muito instáveis e reativos. Esses podem reagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), RNA, proteínas e lipídios alterando as suas funções biológicas e assim desequilibrando a fisiologia celular e tecidual (ALEYNIK et al., 1998).

No combate as ações prejudiciais que esses radicais livres causam, o organismo possui dois tipos de defesa, enzimáticos e não enzimáticos. Entre os mecanismos enzimáticos temos a superóxido dismutase (SOD), que é uma metaloenzima que converte o radical superóxido em H_2O_2 . Em seguida, a enzima catalase (CAT) é capaz de converter o H_2O_2 em água e oxigênio molecular (KRISHNA et al., 1996; PUNTARULO, STOYANOVSKY, CEDERBAUM, 1999).

O encéfalo é um órgão suscetível ao estresse oxidativo, por ter um alto consumo de O_2 e uma moderada defesa antioxidante e característica lipídica, com isso espécies reativas como o H_2O_2 , O_2^- e $ONOO^-$, são capazes de induzir a peroxidação lipídica, ocasionando efeitos negativos e doenças, como disfunção mitocondrial, depressão, transtorno de ansiedade, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (RAMMAL et al., 2008; KROLOW et al., 2014).

Conforme descrito na literatura, o consumo de anabolizantes desencadeia o aumento de estresse oxidativo. Arazi e colaboradores avaliaram parâmetros de estresse oxidativo em homens que utilizavam ou não EAAs após uma única sessão de exercícios de resistência. Os autores relataram através de exames de sangue, pré e pós a sessão de exercícios, que os usuários de EAAs apresentaram níveis oxidantes e antioxidantes maiores nas análises pré exercício, após o exercício esses parâmetros foram aumentados nos dois grupos, mas o grupo que fazia uso de esteroides anabolizantes apresentaram um nível de estresse oxidativo maior sugerindo que esse aumento pode causar um risco maior de lesões em alguns órgãos dos atletas (ARAZI; MOHAMMADJAFARI; ASADI, 2017).

Alguns trabalhos também demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo com as vias inflamatórias, já que o aumento de ROS pode ocasionar danos celulares com um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no SNC com alterações no humor e no comportamento, como a depressão, envolvendo as vias oxidativas e a peroxidação lipídica (SILVERTHORN, 2019).

Estudos publicados na literatura mostram a influência dos EAAs no estresse oxidativo, já que esses podem alterar a função da cadeia respiratória mitocondrial e sistema de monooxigenase, ocorrendo então um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua eliminação (ARAZI; MOHAMMADJAFARI; ASADI, 2017; FRANKENFELD et al., 2014). Frankenfeld mostra que ratos machos *Wistar* que receberam o tratamento com nandrolona apresentaram um desequilíbrio no estado

redox do fígado, coração e rim, levando ao estresse oxidativo, podendo esse estado desencadear danos ao DNA (FRANKENFELD et al., 2014).

Cabe salientar que o uso de EAAs já foi associado a alterações comportamentais, tais como distúrbios de humor e sintomas psicóticos (HALL; HALL; CHAMPMAN, 2005). Ademais sabe-se que o estresse oxidativo está intrinsicamente relacionado a desordens psiquiátricas que causam alterações comportamentais, como a depressão, ansiedade, irritabilidade dentre outras (KANAYAMA; HUDSON; POPE, 2008).

Um estudo realizado por Nikolic e colaboradores avaliou o efeito crônico do decanoato de nandrolona (20 mg/kg) em biomarcadores de estresse oxidativo no coração de ratos sedentários e exercitados. Os resultados mostraram que o decanoato de nandrolona causa um impacto pré-oxidativo tanto sozinho quanto combinado ao exercício físico (NIKOLIC et al., 2015). No entanto pouco estudos na literatura demonstram a associação do estresse oxidativo com as alterações comportamentais associadas ao uso de EAAs. Além disso, até o presente momento não há na literatura estudos que investiguem os efeitos do decanoato de nandrolona sobre o status redox em cultura de astrócitos.

3.6 Astrócitos

Os astrócitos são um tipo de célula encontrada em grande proporção no SNC, possui diversas funções essenciais para a homeostase desse sistema, como a manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, captação e liberação de neurotransmissores, fornecimento de suporte estrutural na função da barreira hematoencefálica e funcionamento das sinapses. Essas células também são responsáveis pela remoção do excesso de glutamato na fenda sináptica em condições fisiológicas, com a intenção de prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica (NEDERGAARD; RANSOM; GOLDMAN, 2003). Os astrócitos juntamente com a micróglia são as células de defesa do SNC (GLASS et al., 2010).

As alterações astrocitárias são observadas em diversas lesões e doenças cerebrais e são caracterizadas por mudanças morfológicas, fisiológicas e moleculares, um processo conhecido como reatividade astrocitária. Quando ocorre essa reatividade das astrócitos, as células passam a ter funções anormais e perdem a capacidade de exercer suas funções de suporte ao tecido neural. Os astrócitos reativos possuem

uma baixa capacidade em sequestrar ROS, já que ocorre uma diminuição na liberação e atividade das enzimas antioxidantes (RAO; WILLINGHAM; YU, 2003).

Os astrócitos são as principais células de defesa antioxidante do tecido nervoso, com a reatividade astrocitária os níveis de radicais livres tendem a aumentar significativamente. Além disso, quando reativos os astrócitos se tornam mais vulneráveis a desbalanços mitocondriais e metabólicos, tornando-se também indutores de estresse oxidativo. O aumento de ROS produzido pelos astrócitos, contribui para a perda da atividade de transporte de glutamato, levando a lesão neuronal. Além disso causa o aumento da peroxidação lipídica, mostrando que o estresse oxidativo provocado pelos astrócitos pode levar a lesões neuronais (SHENG, et al., 2013; OUYANG et al., 2007)

A capacidade de regular os níveis de neurotransmissores na fenda sináptica, que é uma das principais funções dos astrócitos também é prejudicada quando os astrócitos estão reativos, para que ocorra uma elevação da concentração de glutamato extracelular e ocorre uma estimulação dos receptores de glutamato, ocorrendo a excitotoxicidade do glutamato, ocasionando a perda sináptica e morte neuronal (RAO; WILLINGHAM; YU, 2003).

Não há publicações na literatura ainda de estudos que mostrem o efeito da exposição de cultura de astrócitos a EAAs, porém como em estudos com células neuronais esses agentes anabólicos apresentaram efeito tóxico, é de extrema importância o estudo dos efeitos dos EAAs nessas células (CARACI et al., 2011; ZELLEROTH et al., 2019).

Por fim, tendo em vista a maior utilização do decanoato da nandrolona, bem como os seus efeitos neurotóxicos já demonstrados na literatura, é de grande importância investigar os efeitos da exposição de células residentes do SNC, como os astrócitos a esse composto.

4. Resultados

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. As seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Os itens discussão e conclusões que se encontram no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados descritos no manuscrito.

O manuscrito está estruturado de acordo com a revista a qual foi submetido *NeuroToxicology*.

4.1 Manuscrito

Cytotoxic effects of adulterated formulations of nandrolone decanoate in primary astrocyte culture

Gabriela Tolfo Guerra¹, Lucas Moraes Berneira², Alexandre de Mattos Machado³, Fernando Lopez Alvez¹, Natália Pontes Bona², Nathalia Stark Pedra¹, Francieli Moro Stefanello⁴, Claudio Martin Pereira de Pereira², Mayara Sandrielly Soares de Aguiar¹, Roselia Maria Spanevello^{1*}

¹Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Laboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences - Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

²Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Laboratory of Lipidomics and Bioorganic - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences - Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

³ Brazil Scientific and Technical Division, Brazilian Federal Police, Pelotas, 96030-000, Brazil

⁴ Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Laboratory of biomarkers - Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences - Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Roselia Maria Spanevello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil, CEP: 96010-900.

Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354, E-mail: rspanevello@gmail.com

Abstract

Anabolic androgenic steroids (AASs) are synthetic substances derived from testosterone. Several neurotoxic effects of AASs have been described in the literature, and therefore their use is controlled; however, their effects on astrocytes are still poorly understood. In this study, we evaluated the cytotoxic effects of AAS formulations apprehended by the Brazilian Federal Police on primary astrocyte cultures. We used five AAS formulations (named C1, C2, C3, C4, and C5) and one commercial formulation of nandrolone decanoate (ND) as a control. Astrocyte cultures were exposed to C1–C5 and ND at concentrations of 10, 30, or 100 μ M for 48 and 72 h. Cell viability and proliferation, reactive oxygen species (ROS) and nitrite levels, total thiol (SH) content, and superoxide dismutase and catalase (CAT) activities were determined. Three formulations had different compositions than those indicated on their labels. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis identified the presence of ND in C1, C2, and C3; in C4, ND, testosterone propionate, and testosterone cypionate were detected. C5 was supposed to contain ND according to its label, but this compound was not identified by GC-MS. ND increased cell proliferation and viability at 10 μ M, but reduced astrocyte viability at 30 and 100 μ M. ND also increased ROS and nitrite levels and decreased SH levels and CAT activity in astrocytes. All five formulations altered the viability and oxidative stress parameters in astrocytes at some concentrations, but C2 and C5 had more pronounced effects on the redox status of astrocytes. In conclusion, we demonstrated the gliotoxic effects of ND and adulterated AAS formulations on astrocytes. The use of illicit AAS formulations may increase neurotoxic effects, possibly because of their uncertain composition and lack of quality control.

Key-words: nandrolone; astrocytes; oxidative stress; free radicals; cytotoxicity; brain

1. Introduction

Anabolic androgenic steroids (AASs) are synthetic substances derived from testosterone that were originally designed for therapeutic use. However, AASs are often used unlawfully by professional and recreational athletes, as they can increase muscle mass and improve sports performance (Coopman and Cordonnier., 2012). The abuse of these compounds is associated with several side-effects, such as liver damage, physical change disorders, and coronary dysfunction. Consequently, their sale and consumption either controlled or prohibited worldwide (Kicman, 2008).

Nevertheless, although there are strict measures in place to control their use, AASs are some of the most commonly consumed drugs, and they are highly susceptible to adulteration and counterfeiting (Thevis et al., 2008). There has been a considerable increase in apprehensions of AAS formulations, supplied primarily by illicit manufacturers, by the Brazilian Federal Police (Berneira et al., 2019). As these manufacturers do not adhere to the regulations imposed by health agencies, their formulations are subject to contamination, counterfeiting, and adulteration, due to which they pose an even greater risk to the health of users (Neves and Caldas, 2017; Berneira et al., 2019).

AASs target different organs and systems, and their adverse effects can be observed in the reproductive, hepatic, renal, cardiovascular, and endocrine systems (Scaccianoce et al., 2013). AAS abuse can also result in behavioral and neuropsychiatric effects and cognitive deficits (Shahidi, 2001). Moreover, studies have demonstrated that the inappropriate use of these compounds can induce neurodegeneration; although the mechanisms by which this occurs remain unclear, it has been demonstrated that apoptosis and oxidative stress represent the major signaling pathways involved in AAS neurotoxicity (Pomara et al., 2015).

Nandrolone decanoate (ND) is a class II AAS and a 19-nortestosterone derivative (Patané et al., 2020). Although this drug has many clinical therapeutic applications, it is also one of the most commonly abused injectable AASs for promoting muscle growth and athletic performance worldwide (Patanè et al., 2020). ND has more anabolic than androgenic effects when compared to testosterone; this reduction in androgenic effects may be due to the inactivation of nandrolone by 5 α -reductase via transformation into the low affinity androgen receptor ligand 5 α -dihydronandrolone (Monda et al., 2017; Patanè et al., 2020). Although the effects of ND on the brain have

not yet been fully clarified, studies have found this drug to affect brain neurochemical pathways in experimental models (Busardò et al., 2015; Turilazzi et al., 2016; Zellerroth et al., 2019).

Astrocytes are the most abundant cells in the mammalian central nervous system (CNS) and are responsible for several physiological functions. Astrocytes interact with neurons to provide structural support and aid in metabolic coupling to then serve as a source of nutrients and to provide storage for neurons (Magistretti, 2006; Walz, 2000; Santello et al., 2019). However, under certain conditions, astrocytes may act as major sources of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) to promote reactive astrogliosis, microglial activation, inflammation, and neural damage (Cheng et al., 2020). Studies on the effects of the indiscriminate use of AASs on astrocytes are scarce; however, data show that AASs can result in dysfunctions related to mitochondrial respiration, oxidative damage, and cellular damage (Busardò et al., 2015; Turilazzi et al., 2016; Zellerroth et al., 2019, Carteri et al., 2019), which in turn can lead to alterations in astrocyte function.

Thus, considering the extensive side-effects associated with the abuse of AASs, as well as the high rates of illicit distribution of spurious formulations of anabolic agents and their impact on user health, the aim of this study was to evaluate the chemical composition of AAS formulations apprehended by the Brazilian Federal Police using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Additionally, the cytotoxic effects of formulations containing ND on primary astrocyte cultures were also evaluated.

2. Methodology

2.1 AAS formulations

Five oil-based AAS formulations apprehended by the Brazilian Federal Police in Pelotas, Brazil in 2017 were kindly provided to our research laboratory. These samples were named C1, C2, C3, C4, and C5. As a standard for comparison, we used the commercial ND formulation Deca-Durabolin (50 mg) from Aspen Pharma.

2.2 Chromatographic analysis

Samples were prepared as described by Neves and Caldas (2017) with some modifications. Sample (10 μ L) was added to 1.0 mL of chloroform directly in a vial and then homogenized and injected in split mode (1:25) into a GC-MS instrument

(QP2010SE; Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an Rtx-5MS capillary column (Restek, Bellefonte, USA) using helium as the carrier gas. The temperatures of the injection port and transfer line were 280 °C and 300 °C, respectively. In the oven, the programmed temperature for the initial 2 min was 100 °C, which was increased 30 °C min⁻¹ to 280 °C and then gradually increased 2 °C min⁻¹ to a final temperature of 310 °C, which was maintained for 10 min. The mass spectrometer operated with ion electron ionization at 70 eV in the ion source, scanning from m/z 30 to m/z 550. The compounds were identified by comparing the resulting mass spectra with those in the NIST-08 library.

2.3 Animals and tissue collection

Newborn Wistar rats (1–2 day old) were obtained from the Central Animal House of the University Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were housed at a constant temperature (22 ± 1 °C) and maintained under a standard 12 h dark-light cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). All related protocols were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, RS, Brazil (protocol number: 023368/2021-37). The use of animals was in accordance with the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DCBA 2013).

2.4 Primary astrocyte culture and AAS exposure

Primary astrocyte cultures were prepared as previously described by Gottfried et al. (1999). The cerebral cortex of newborn (1–2 day old) Wistar rats was removed and dissociated in calcium- and magnesium- free balanced salt solution (pH 7.4) by sequential passage through a pipette after removal of the meninges. The cell suspensions were then centrifuged for 10 min at 1000 rpm, and the sedimented cells were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; pH 7.6). Thereafter, the cells were seeded in 96-well and 6-well plates pretreated with poly-L-lysine. Four hours after seeding, the plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fresh medium was added. Cultures were maintained in 5% CO₂ at 37 °C in a humidified atmosphere for cell maturation and differentiation for 20 days until confluence, with culture medium being replaced every 4 days. AAS formulations were dissolved in dimethyl sulfoxide

(DMSO; Sigma-Aldrich) and administered to astrocyte cultures at final concentrations of 10, 30, and 100 μ M for 48 and 72 h. Control cells maintained in DMEM with 10% FBS were treated with 0.1% DMSO (v/v) only (Figure 1). The concentrations of the AASs used were based on previous studies on primary rat cortical cell cultures (Zellerroth et al., 2019).

2.5 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Cell viability was determined using the MTT assay, in which the number of cells with metabolically active mitochondria is estimated based on the reduction of the tetrazolium salt MTT to formazan. This reduction converts the yellow water-soluble tetrazolium salt to an insoluble violet crystal form (formazan). Briefly, cells were washed with PBS, after which 0.5 mg/mL MTT was added to each well. Cells were then incubated for 90 min at 37 °C in 5% CO₂. The MTT solution was removed, and the precipitate was dissolved in DMSO. Absorbance at 492 nm, which is linearly proportional to the number of cells with active mitochondria, was determined using a microplate reader.

2.6 Cell proliferation assay

The sulforhodamine B (SRB) assay was used to determine cell density based on cellular protein levels. Briefly, cells were washed and fixed in 50% trichloroacetic acid for 45 min at 4 °C. After five washes with distilled water, 0.4% SRB in acetic acid was added. After incubation for 30 min, the plates were washed five times with 1% acetic acid to completely remove unbound dye. Finally, the dye was eluted in 10 mM Tris solution, and absorbance at 530 nm was measured.

2.7 Oxidative stress parameters

2.7.1 ROS assay

ROS formation was determined according to the method described by Santos et al. (2017) using the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. DCFH-DA reacts with ROS and consequently emits fluorescence. Intact cells were incubated with 1 μ M DCFH-DA in serum-free medium for 30 min at 37 °C, and fluorescence was determined using a multi-well plate reader (485/520 nm). ROS production was reported as a percentage of untreated cells (control).

2.7.2 Total sulfhydryl (SH) content

The total SH content in astrocyte lysates was determined using the Pierce Ellman's Reagent (DTNB) method as described by Aksenov and Markesbery (2001). The reaction is based on the reduction of DTNB by thiols, which results in the formation of a yellow derivative, 2-nitro-5-mercapto-benzoic acid (TNB) whose absorption is read at 412 nm. The results are expressed in nmol TNB/mg of protein.

2.7.3 Nitrite assay

This assay is based on the colorimetric reaction of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Griess reagent) (Stuehr and Nathan 1989). Sulfanilamide in 5% phosphoric acid was added to cell culture supernatant. After the reagents were mixed, samples were maintained at room temperature for 10 min. Subsequently, Griess reagent was added, and samples were incubated for 10 min in the dark. Absorbance at 540 nm was measured, and nitrite levels were estimated using the sodium nitrate standard curve.

2.7.4 Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD activity in lysates was measured according to the method of Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation; spectrophotometric detection is at 480 nm. The specific activity of SOD is reported in terms of units/mg of protein.

2.7.5 Catalase (CAT) assay

CAT activity was determined according to the method described by Aebi (1984). Absorbance at 240 nm due to the decomposition of H₂O₂ was determined at ambient temperature, with CAT activity expressed in terms of units/mg of protein.

2.8 Protein estimation

For oxidative stress parameters, protein concentrations were estimated using the method described by Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as the standard.

2.9 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used for multiple comparisons. All data are expressed as the mean $\pm$ standard error, and differences between mean values were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Sample composition

Chromatographic analysis showed that the compositions of three of the apprehended formulations provided by the Brazilian Federal Police differed from those indicated on their labels. Formulations C1 and C2 were not labeled, but ND was identified in both samples. Although the label of formulation C3 stated that it contained only boldenone undecylenate, our chromatographic analysis showed the presence of ND in the formulation. The label of formulation C4 mentioned testosterone propionate as the active ingredient, but chromatographic analysis identified the active compounds as ND, testosterone propionate, and testosterone cypionate. Formulation C5 was supposed to contain ND as an active ingredient; however, ND was not identified in chromatographic analysis. The characteristics of all formulations are presented in Table 1.

3.2 Cell viability and proliferation

After 48 h of exposure to the AAS formulations, increased proliferation was observed in astrocytes treated with 10 μ M ND and C1 compared to that in control cells ($P < 0.05$, Figure 2). Increased proliferation was also observed in cells treated with 30 μ M ($P < 0.01$) and 100 μ M ($P < 0.001$) of formulation C3 as compared to that in control cells (Figure 2). Formulations C2, C4, and C5 did not alter astrocyte proliferation at any concentration at 48 h ($P > 0.05$, Figure 2). After 72 h, ND and C1 increased astrocyte proliferation at a concentration of 10 μ M, whereas C3 and C4 increased proliferation at 100 μ M ($P < 0.01$, Figure 3). No significant changes were observed when astrocytes were treated with formulations C3 and C4 for 72 h (Figure 3).

Regarding cell viability, after 48 h, ND was found to reduce astrocyte viability at concentrations of 30 and 100 μ M ($P < 0.001$) compared to that of untreated cells. Formulations C2 and C5 reduced cell viability only at the highest tested concentration (100 μ M), whereas C4 reduced astrocyte viability at concentrations of 30 and 100 μ M compared to that in the control group ($P < 0.05$). On the other hand, formulations C4 and C3 increased cell viability at concentrations of 10 and 100 μ M, respectively ($P < 0.05$). No changes were observed after 48 h of treatment with C1 (Figure 4). After 72 h, ND, C1, C2, C4, and C5 increased astrocyte viability at a concentration of 10 μ M and C3 at a concentration of 100 μ M, compared to that of control cells ($P < 0.05$).

Astrocyte viability decreased after C4 treatment at concentrations of 30 and 100 μM ($P<0.001$) and C5 treatment at 100 μM ($P<0.05$, Figure 5).

3.3 Oxidative stress parameters

Figures 6 and 7 show the ROS levels in astrocytes exposed to the AAS formulations for 48 and 72 h. After 48 h, an increase in ROS levels was observed in astrocytes exposed to ND ($P<0.05$) and the C4 ($P<0.05$) and C5 ($P<0.001$) formulations at a concentration of 10 μM compared with those in control cells. However, ROS levels decreased when astrocytes were exposed to 100 μM C1 or C2 compared to those in the control group ($P<0.05$). After 72 h, an increase in ROS levels was observed in cells exposed to C1 ($P<0.05$), C2 ($P<0.01$), or C4 ($P<0.05$) at a concentration of 10 μM and C5 at all tested concentrations ($P<0.05$) compared to that in control cells. ND also increased ROS levels in astrocyte cultures at concentrations of 10 μM and 30 μM ($P<0.05$) (Figure 7). No changes in ROS levels were observed after exposure of astrocytes to formulation C3 for 48 and 72 h (Figure 6 and 7).

Figure 8 shows the nitrite levels after 48 h of astrocyte exposure to the AAS formulations. Nitrite levels increased in cells treated with 100 μM ND ($P<0.001$), C3 ($P<0.05$), and C4 ($P<0.05$) when compared with that in control cells. In addition, C2 decreased nitrite levels at 10 μM ($P<0.001$), 30 μM ($P<0.001$), and 100 μM ($P<0.05$), whereas C5 reduced nitrite levels at 10 μM ($P<0.05$) compared to that in control cells (Figure 8). C1 did not cause any change in nitrite levels in astrocyte cultures ($P>0.05$, Figure 8).

SH levels in astrocytes decreased after treatment with 30 or 100 μM ND ($P<0.05$) compared to that in the control group (Figure 9). A decrease in SH levels was also observed at all evaluated concentrations of C2 and C5 and the highest tested concentration of C1 ($P<0.001$). In contrast, C3 increased SH levels at all major concentrations tested ($P<0.05$), while C4 did not cause any changes in SH levels ($P>0.05$) in primary astrocyte cultures (Figure 9).

Figure 10 shows the effects of AASs on SOD activity in astrocytes. After 48 h of exposure, the C2 and C5 formulations decreased SOD activity at all evaluated concentrations ($P<0.01$), whereas C4 induced an increase in SOD activity in astrocyte cultures ($P<0.01$). No significant changes in SOD activity were observed when astrocytes were treated for 48 h with C1, C3, or ND. Furthermore, we observed decreased catalase activity at all evaluated concentrations of C1, C2, C5, and ND

($P < 0.05$) compared to that in control cells (Figure 11). No alterations in catalase activity were observed in astrocytes after 48 h of exposure to C3 and C4 ($P > 0.05$, Figure 11).

4. Discussion

AAS abuse by recreational athletes is a public health problem, as evidence suggests that supraphysiologic doses of AAS may have adverse effects on several organ systems, including the brain (Kanayama et al., 2018). In addition, clandestine production of AASs is another factor to be considered regarding their side-effects—considering that this illicit practice is usually conducted without quality control, it often leads to contamination or alteration of the specific chemical composition of AASs. Approximately 30% of the AAS formulations apprehended by law-enforcement agencies are counterfeit, and can cause serious side-effects to users (Neves et al., 2013).

In this study, we evaluated the chemical composition and cytotoxic effects on astrocytes of five AAS formulations apprehended by the Brazilian Federal Police. All evaluated formulations were found to be adulterated: as shown by GC-MS analysis, two samples did not contain the active ingredient mentioned on the label, and three formulations had inconsistencies with regard to the active ingredient described on the label. Similar results were also described by Berneira et al. (2019) after analysis of AAS formulations apprehended by the Brazilian Federal Police based on visual inspection and Fourier transform infrared spectroscopy, GC-MS, and differential scanning calorimetry analyses.

Considering that GC-MS detected the presence of the active substance ND in four compounds, we also used a commercial ND formulation as a control. ND is one of the most commonly abused injectable AASs, and its neurotoxic effects, such as increased aggressive behavior, anxiogenic and anxiolytic effects (Busardò et al., 2015), and memory impairment (Magnusson et al., 2009), have been well-documented in the literature.

The results of this study showed, that a commercial formulation of ND increased astrocyte viability and proliferation at a concentration of 10 μM , while at the higher evaluated concentrations (30 and 100 μM), these parameters decreased compared to those in control cells. These results are in accordance with previous studies that have also demonstrated that repeated exposure to ND (30 and 100 μM) resulted in reduced cell viability in primary cortical cultures in association with apoptosis mediated by

androgen receptor activation (Zelleroth et al., 2019). In fact, there is growing evidence for the potential role of apoptosis and oxidative stress in nandrolone-mediated neurotoxicity (Pomara et al., 2015).

Oxidative stress is characterized by an imbalance between free radical formation and the ability of cells to detoxify these reactive products (Pizzino et al., 2017). At physiological levels, ROS and RNS have important regulatory functions, but an uncontrolled increase in ROS/RNS is associated with a reduced antioxidant barrier, leading to damage to biological molecules such as lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids and resulting in neurological disturbances (Floyd and Hensley, 2002). In this study, oxidative stress analyses were performed only within 48 h, as the amount of sample available for testing was small.

It is well established in the literature that the CNS is more susceptible to oxidative damage because it is rich in iron, the membrane lipids are very rich in polyunsaturated fatty acid side chains that are targets of free radical attack, and the CNS has low catalase activity and only moderate amounts of other antioxidant enzymes such as SOD (Halliwell, 1992). SOD is a very important component of the cellular antioxidant defense against oxidative stress, because it reduces the levels of the dangerous free radical anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$). SOD catalyzes the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ into molecular oxygen and H_2O_2 (Younus, 2018), which is subsequently degraded to water and oxygen by catalase (Halliwell, 1992).

In this study, we showed that micromolar concentrations of ND increased ROS and nitrite levels and decreased SH levels and catalase activity in astrocytes, possibly leading to increased H_2O_2 levels. This pathway can be associated with the gliotoxic effect of ND, because studies have shown that excess H_2O_2 alters astrocytic cytoskeletal properties (Zhu et al., 2005) and metabolism (Liddell et al., 2009), causing dysfunctions in these cells. In addition, several studies have reported oxidative damage induced by ND in different brain regions in rats (Martins et al., 2011; Tugyan et al., 2013; Turillazzi et al., 2016; El-Shamarka et al., 2020).

Astrocytes provide structural and metabolic support to neurons, and maintain homeostasis by degrading free radicals through the production and release of antioxidants under physiological conditions. However, under neurotoxic and/or pathological conditions, astrocytes can be activated to result in excessive secretion of ROS/RNS and pro-inflammatory cytokines, glial scar formation, dysregulation of

excitatory amino and neuronal apoptosis, thus aggravating brain damage (Rizor et al., 2019; Chen et al., 2020).

Considering that mitochondria are the main source of free radicals, the increase in ROS levels induced by ND may be attributed to mitochondrial dysfunction (as shown using the MTT assay) associated with a decrease in antioxidant defenses related to catalase and SH content. In addition, ND-induced increase in nitrite levels can lead to the formation of nitrite peroxide, a highly cell-damaging reactive species (Aleynik et al., 1998). Thus, our results demonstrate that ND leads to astrocytic oxidative/nitrosative stress, corroborating previous reported findings regarding the neurotoxic effects of AASs.

The illicit production and distribution of anabolic agents is another factor to be considered with regard to the effects of AASs. The use of these illegal formulations may increase neurotoxic effects due to their uncertain composition and lack of quality control during production. Therefore, we also analyzed the cytotoxic effects of five AAS formulations (C1–C5) apprehended by the Brazilian Federal Police. According to our GC-MS analysis, formulations C1, C2, and C3 showed the presence of only ND, while C4 also contained testosterone propionate and testosterone cypionate besides ND. C1 and C2 had similar effects on proliferation, viability, and ROS levels as the commercial ND sample. In contrast, the C2 formulation reduced nitrite levels, SH content, and SOD and CAT activities at all evaluated concentrations. Surprisingly, C5 had a pronounced effect on oxidative stress parameters, but GC-MS analysis did not identify ND in the formulation, as reported in the product label.

One study on 40 steroidal oil-based formulations (confiscated from individuals suspected to use AASs or to be involved in the black marketing of their counterfeits) reported that 52% of the active ingredients did not match those mentioned on the label: the preparations either did not contain the active compound or contained more active ingredients or different quantities of ingredients (Fabresse, et al., 2021). Berneira et al. (2019) also demonstrated the presence of only excipients and differences in active ingredient concentrations compared to those mentioned on the labels in apprehended AAS formulations. Taken together, these findings point to adulterated formulations of AASs posing an increased risk to user health—issues with the quality and purity of the final product can lead to an adulterated formulation or a product of unsatisfactory standard capable of inducing more potent toxic effects in various organs, including the brain.

In conclusion, the results of our chromatographic analysis indicate that all the formulations provided by the Brazilian Federal Police tested in this study were falsified. We also showed that these formulations induced toxic effects in primary astrocyte cultures, which may be associated with oxidative damage (Figure 12). The related astrocytic dysfunctions may contribute to the brain damage associated with AAS abuse. In addition, the use of illicit AAS formulations may increase neurotoxic effects, possibly due to their uncertain composition and lack of quality control. Nevertheless, further studies are necessary to elucidate the actual mechanisms involved in the gliotoxic effects of AASs, including ND.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Brazilian Federal Police (Pelotas, Rio Grande do Sul State) for the samples, to the Forensic National Institute of Science and Technology (Grant number 465450/2014-8), FAPERGS and CNPq for research funding. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES - Finance code 001) also financed this study in part.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
- Aksenov M. Y., Markesbery W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 302, 141–145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6).
- Aleynik, S. I., Leo, M. A., Aleynik, M. K., Lieber, C. S., 1998. Increased circulation products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res.* 22, 192-196.
- Berneira, L., Freitas, S., Da Silva, C., Machado, A. M., Pereira, C. M. P., Ziemann dos Santos, M. A., 2019. Application of differential scanning calorimetry in the analysis of apprehended formulation of anabolic androgenic steroids. *Forensic Science International.* 296, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.022>.

Busardò, F. P., Frati, P., Di Sanzo, M., Napoletano, S., Pinchi, E., Zaami, S., Fineschi, V., 2015. The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuroparmacol.* 13, 1, 122-131. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210225822>.

Carteri, R. B., Kopczynski, A., Rodolphi, M. S., Strogulski, N. R., Wannmacher, C. M. D., Franceschi, I. D., Hammerschmitt, M. E., Driemeier, D., Portela, L. V., 2019. Anabolic-androgenic steroids impair mitochondrial function and redox status in the heart and liver of mice. *Steroids.* 172, 108861. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108861>.

Cheng, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., Zhou, L., 2020. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif.* 53, 3. <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>.

Coopman, V., Cordonnier, J., 2012. Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders. *Ann. Toxicol. Anal.* 24, 2, 73-80. <https://doi.org/10.1051/ata/2012012>.

El-Shamarka, M. E. S., Sayed, R. H., Assaf, N., Zeidan, H. M., Hashish, A. F., 2020. Combined neurotoxic effects of cannabis and nandrolone decanoate in adolescent male rats. *Neurotoxicology.* 76, 114-125. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.11.001>.

Fabresse, N., Gheddar, L., Kintz, P., Knapp, A., Labari, I. A., Alvarez, J. C., 2021. Analysis of pharmaceutical products and dietary supplements seized from the black Market among bodybuilders. *Forensic Sci Int.* 322, 110771. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110771>.

Floyd, R. A., Hensley, K., 2002. Oxidative stress in brain aging implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging.* 23, 5, 795-807. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00019-2).

Gottfried, C., Valentim, L., Salbego, C., Karl, J., Wofchuk, S. T., Rodnight R., 1999. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res.* 833, 142-149.

Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59, 5, 1609-1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>.

Kanayama, G., Kaufman, M. J., Pope H. G., 2018. Public Health Impact of Androgens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 25, 3, 218-223. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000404>.

Kicman, A. T., 2008. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol.* 154, 502-521. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.165>.

Liddell, J. R., Zwingmann, C., Schmidt, M. M., Thiessen, A., Leibfritz, D., Robinson, S. R., Dringen, R., 2009. Sustained hydrogen peroxide stress decreases lactate production by cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience Research.* 87, 12, 2696-2708. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22093>.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.

Magistretti, P. J., 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 209, 2304-2311. <https://doi.org/10.1242/jeb.02208>.

Magnusson, K., Hanell, A., Bazoy, I., Clausen, F., Zhou, Q., Nyberg, F., 2009. Nandrolone decanoate elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats. *Neurosci Lett.* 467, 3, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.09.041>.

Martins, D. B., Lopes, S., Mazzanti, C., Spanevello, R., Schmatz, R., Corrêa, M., Stefanello, N., Schetinger, M., Morsch, V., Veiga, A., 2011. Lipid peroxidation in rats treated with vincristine sulphate and nandrolone decanoate. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 1, 107-113. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100017>.

Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247, 3170-3175.

Monda, V., Salerno, M., Fiorenzo, M., Villano, I., Viggiano, A., Sessa, F., Triggiani, A.I., Cibelli, G., Valenzano, A., Marsala, G., Zammit, C., Ruberto, M., Messina, G., Monda, M., Luca, V., Messina, A., 2017. Role of sex hormones in the control of vegetative and

metabolic functions of middle-aged women. *Front Physiol.* 8, 773. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00773>.

Neves, D. B. da J. N., Marcheti, R. G., Caldas, E. D., 2013. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. *Forensic Sci Int.* 228, 1-3, 81-83. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.02.035>.

Neves, D. B. da J.; Caldas, E. D., 2017. GC–MS Quantitative Analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci Int.* 275, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.016>.

Patanè, F. G., Liberto, A., Maglitto, A. N. M., Malandrino, P., Esposito, M., Amico, F., Cocimano, G., Li Rosi, G., Condorelli, D., Di Nunno, N., Montana, A., 2020. Nandrolone Decanoate: Use, abuse and side effects. 56, 11, 606. <https://doi.org/10.3390/medicina56110606>.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.

Pomara, C., Neri, M., Bello, S., Fiore, C., Riezzo, I., Turillazzi, E., 2015. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: Oxidative Stress, apoptosis and neuropathology: A review. *Curr Neuropharmacol.* 12, 1, 132-146. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210221434>.

Rizor, A., Pajarillo, E., Johnson, J., Aschner, M., Lee, E., 2019. Astrocytic oxidative/nitrosative stress contributes to Parkinson's disease pathogenesis: the dual role of reactive astrocytes. *Antioxidants.* 8, 8, 265. <https://doi.org/10.3390/antiox8080265>.

Santello, M., Toni, N., Volterra, A., 2019. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci.* 22, 2, 154-166. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>.

Santos, L. M., Silva, T. M., Azmbuja, J. H., Ramos, P. T., Oliveira, P. S., Silveira, E. F., Pedra, N. S., Galdino, K., Couto, C. A. T., Soares, M. S. P., Tavares, R. G.,

Spanevello, R. M., Stefanello, F. M., Braganhol, E., 2017. Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 424, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2843-6>.

Scaccianoce, S., Caruso, A., Miele, J., Nistico, R., Nicoletti, F., 2013. Potential neurodegenerative effects of anabolic androgenic steroid abuse. *J Biol Regul Homeost Agents*. 27, 107-114.

Shahidi, N.T., 2001. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.* 23, 9, 1355-1390. [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-2918\(01\) 80114-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-2918(01) 80114-4).

Stuehr, D. J., Nathan, D. F., 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. 169, 1543-1555. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>.

Thevis, M., Schrader, Y., Thomas, A., Sigmund, G., Geyer, H., Schänzer, W., 2008. Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches. *J Anal Toxicol.* 32, 232-240. <https://doi.org/10.1093/jat/32.3.232>.

Tugyan, K., Ozbal, S., Cilaker, S., Kiray, M., Pekcetin, C., Ergur, B. U., Kumral, A., 2013. Neuroprotective effects of erythropoietin on nandrolone decanoate-induced brain injury in rats. *Neuroscience Letters*. 533, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.10.004>.

Turillazzi, E., Neri, M., Cerretani, D., Cantatore, S., Frati, P., Moltoni, L., Brusardò, F. P., Pomara, C., Riezzo, I., Fineschi, V., 2016. Lipid peroxidation and apoptotic response in rat brain areas induced by long-term administration of nandrolone: the mutual crosstalk ROS and NF- κ B. *J Cell Mol Med*. 20, 4, 601-612. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12748>.

Walz, W., 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int*. 36, 291-300. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00137-0).

Younus, H., 2018. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci.* 13, 3, 88-93. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.

Zelleroth, S., Nylander, E., Nyberg, F., Grönbladh, A., Hallberg, M., 2019. Toxic Impact of Anabolic Androgenic Steroids in Primary Rat Cortical Cell Cultures. *Neuroscience.* 397, 15, 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.035>.

Zhu, D., Tan, K. S., Zhang X., Sun, A. Y., Sun, G. Y., Lee, J. C. M., 2005. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of Cell Science.* 118, 3695-3703. <https://doi.org/10.1242/jcs.02507>.

Table 1 - Characteristics of the analyzed samples originally apprehended by the Brazilian Federal Police and the components identification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Sample	Solution form	Declared component	Declared concentration	Component identified using GC-MS
Nandrolone decanoate	Oil-based solution	Nandrolone decanoate	50 mg	Nandrolone decanoate
C1	Oil-based solution	**	**	Nandrolone decanoate
C2	Oil-based solution	**	**	Nandrolone decanoate
C3	Oil-based solution	Boldenone undecylenate	250 mg	Nandrolone decanoate
C4	Oil-based solution	Testosterone propionate	**	Testosterone propionate Nandrolone decanoate Testosterone cypionate
C5	Oil-based solution	Nandrolone decanoate	50 mg	#

** No information on the label.

Not identified in GC-MS analysis.

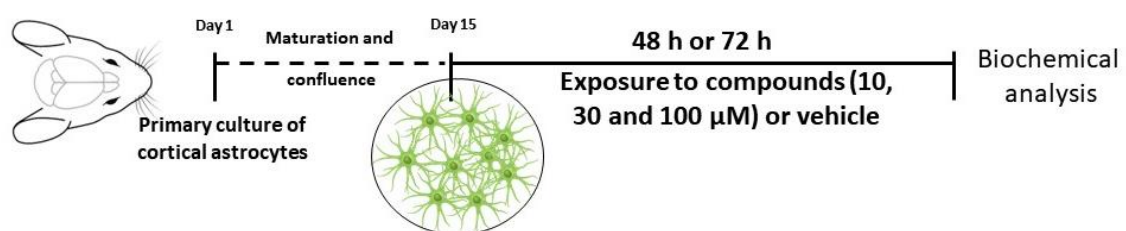


Figure 1 - Experimental scheme of astrocyte exposure to AAS formulations.

Cell proliferation 48 h

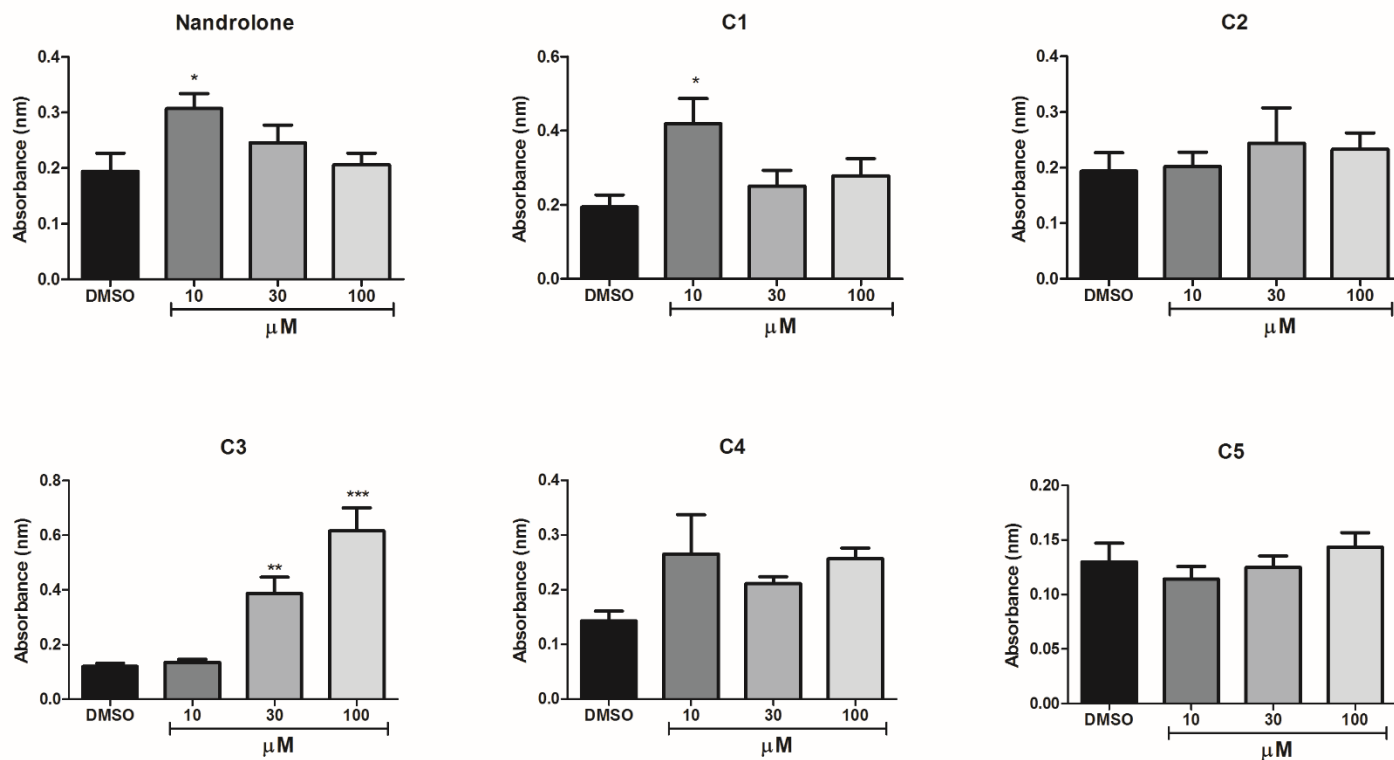


Figure 2 - Effect of treatment with a commercial formulation of nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μM) for 48 h on cell proliferation in astrocyte culture. Data are expressed as the mean ± standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. *P < 0.05, ** P < 0.01, and ***P < 0.001; differences compared to control cells (DMSO group).

Cell proliferation 72 h

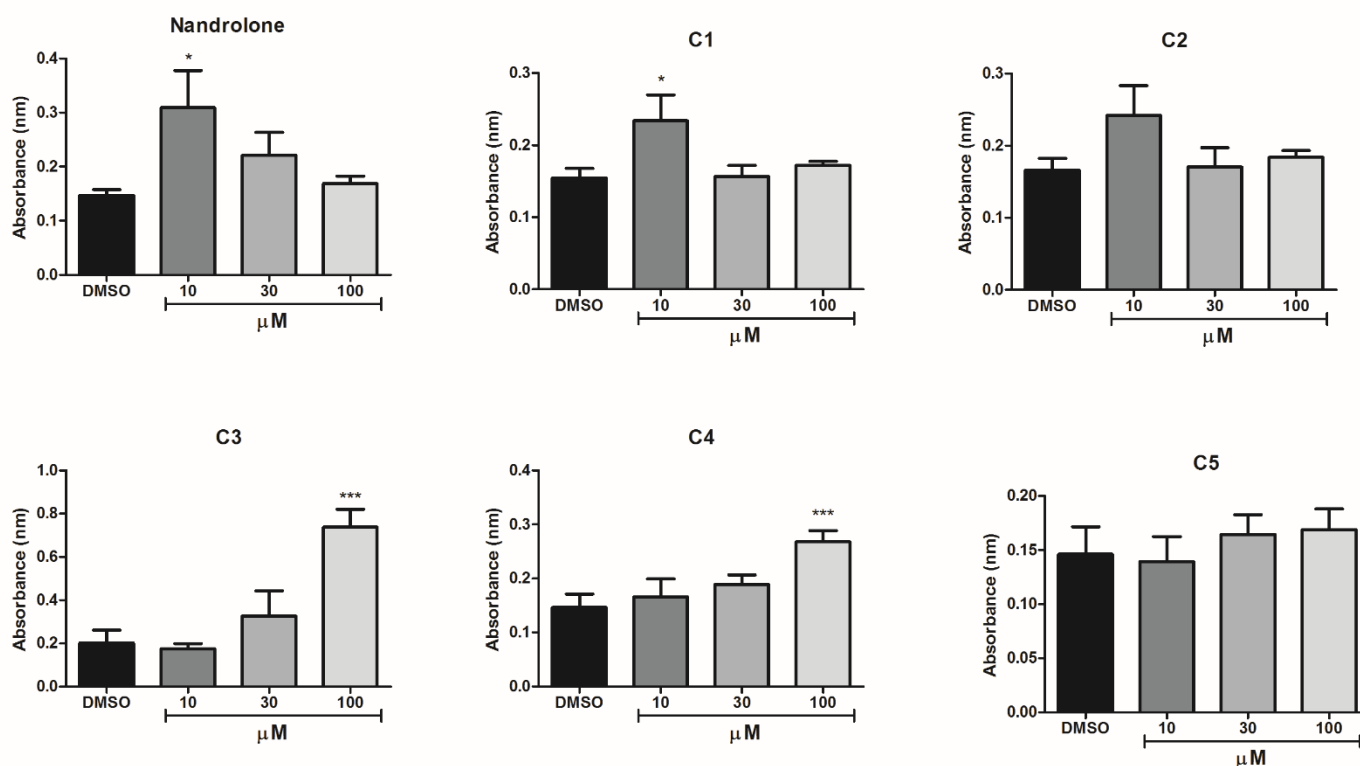


Figure 3 - Effect of treatment with a commercial formulation of nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μM) for 72 h on cell proliferation in astrocyte culture. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

Cell viability 48 h

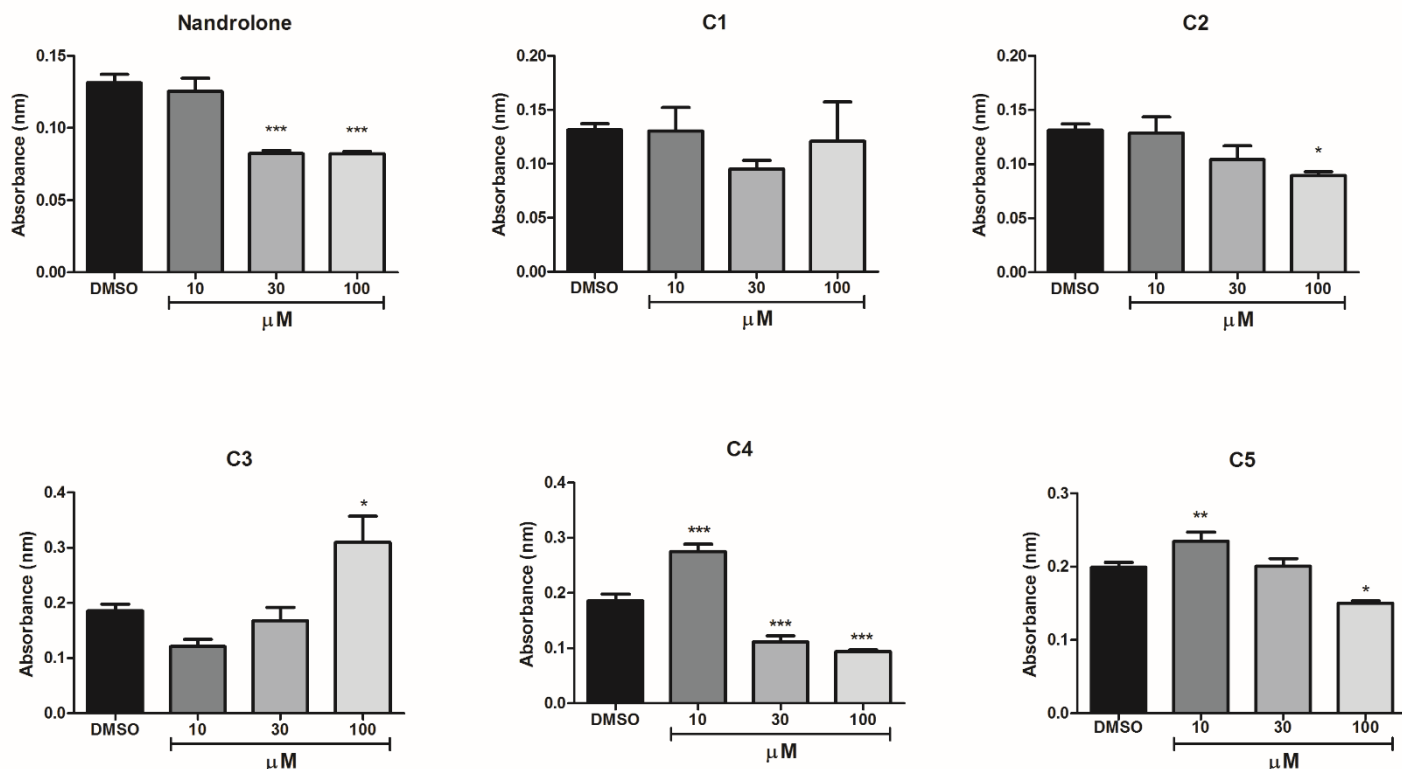


Figure 4 - Effect of treatment with a commercial formulation of nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μM) for 48 h on cell viability in astrocyte culture. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

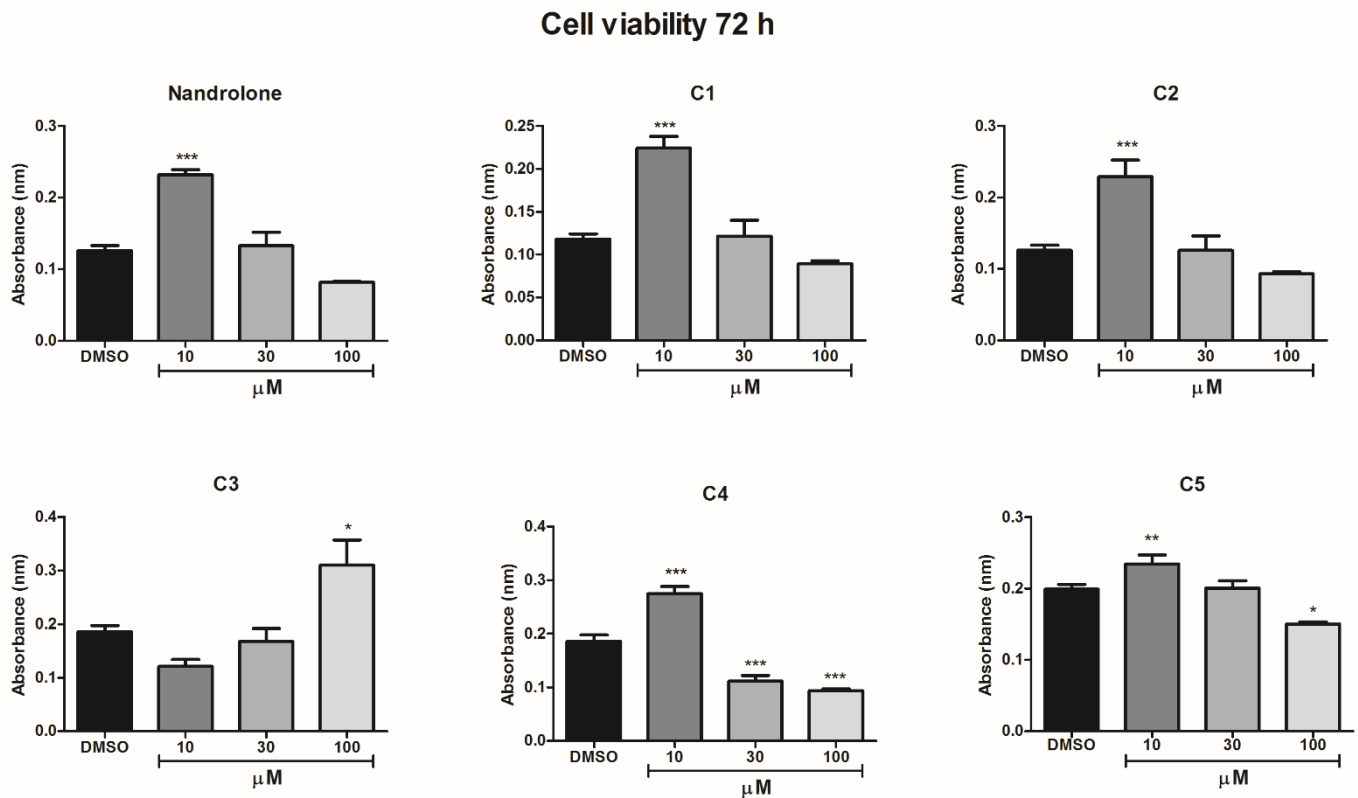


Figure 5 - Effect of treatment with a commercial formulation of nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μM) for 72 h on cell viability in astrocyte culture. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

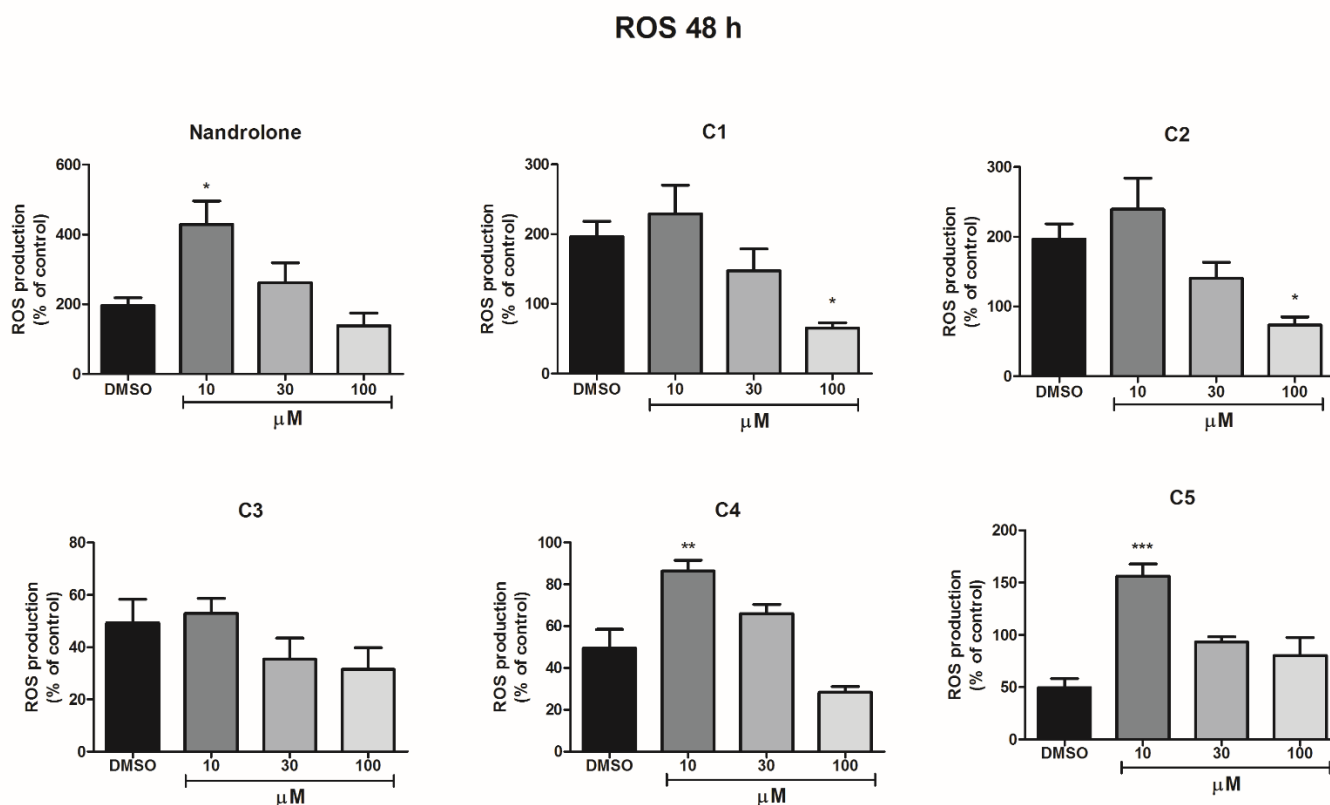


Figure 6 - Levels of reactive oxygen species (ROS) in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4 or C5 (10, 30, and 100 μM) for 48 h. Data are expressed as the mean ± standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

ROS 72 h

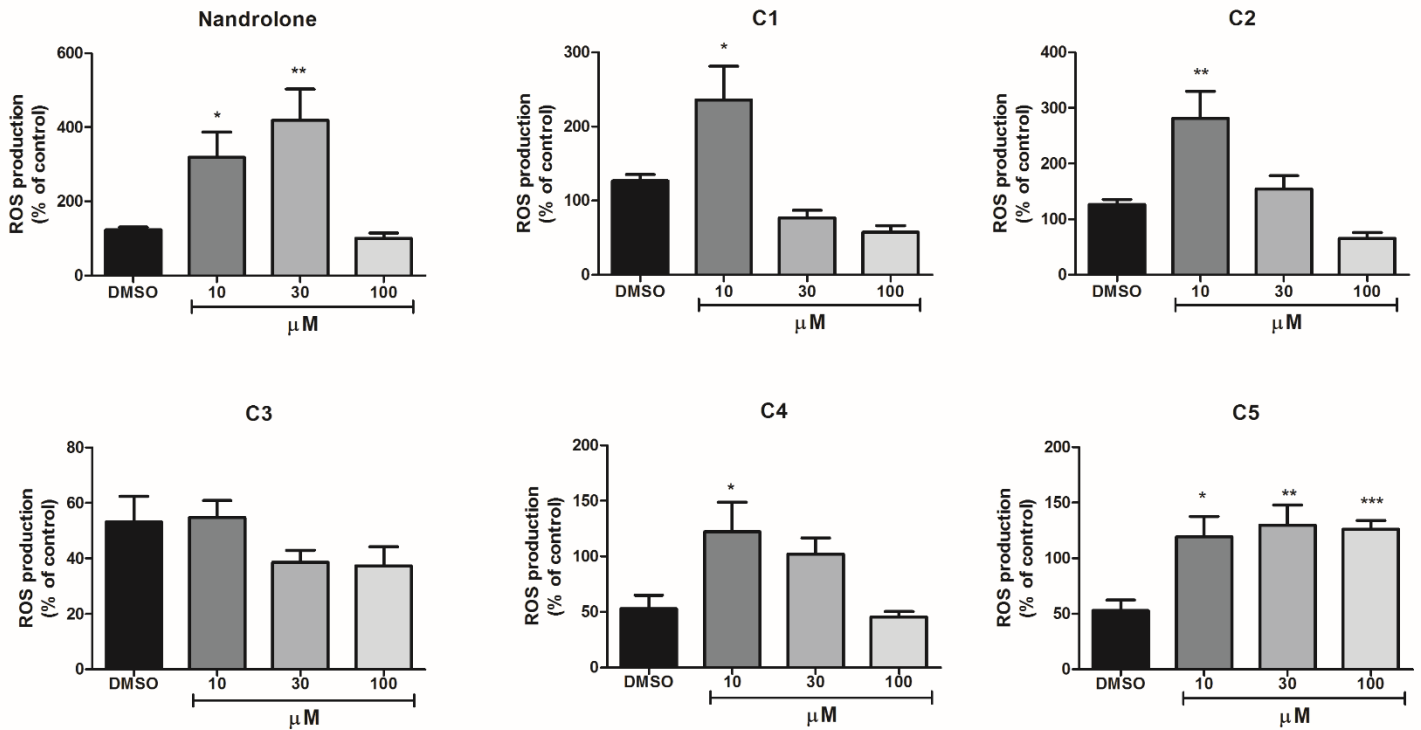


Figure 7 - Levels of reactive oxygen species (ROS) in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μ M) for 72 h. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. *P < 0.05, ** P < 0.01, and ***P < 0.001; differences compared to control cells (DMSO group).

Nitrite 48 h

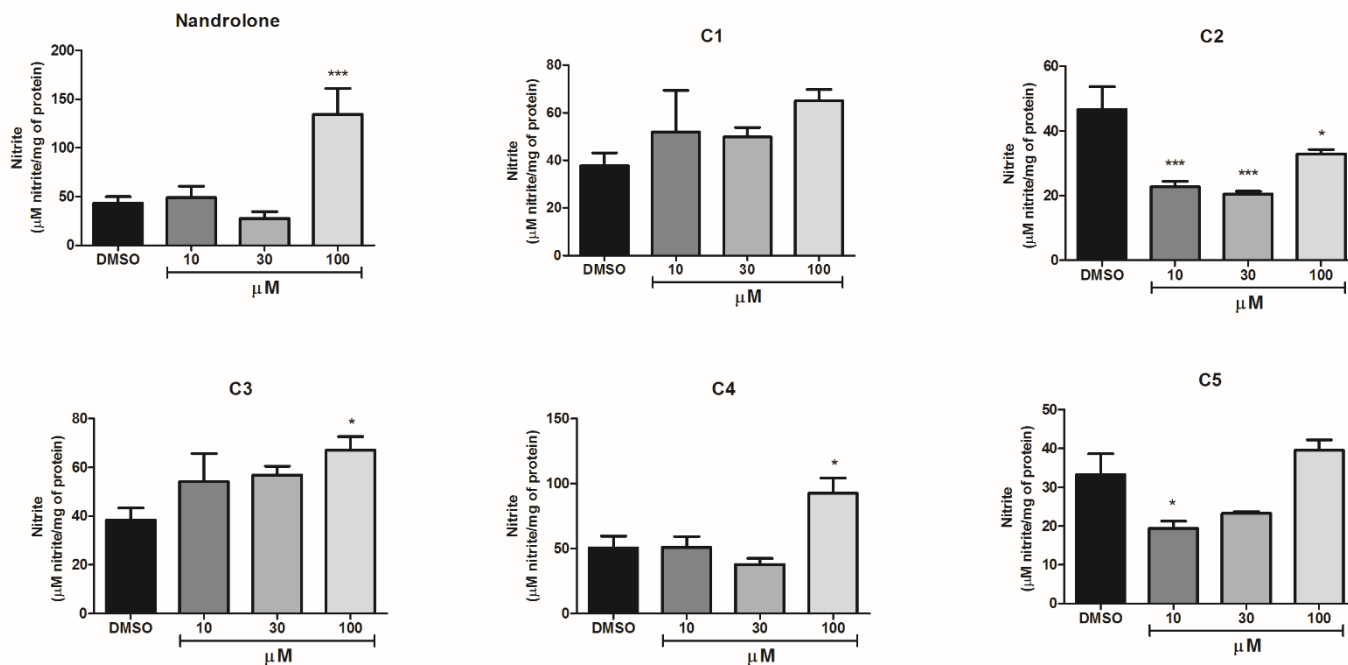


Figure 8 - Nitrite levels in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 µM) for 48 h. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. *P < 0.05 and ***P < 0.001; differences compared to control cells (DMSO group).

SH - 48 h

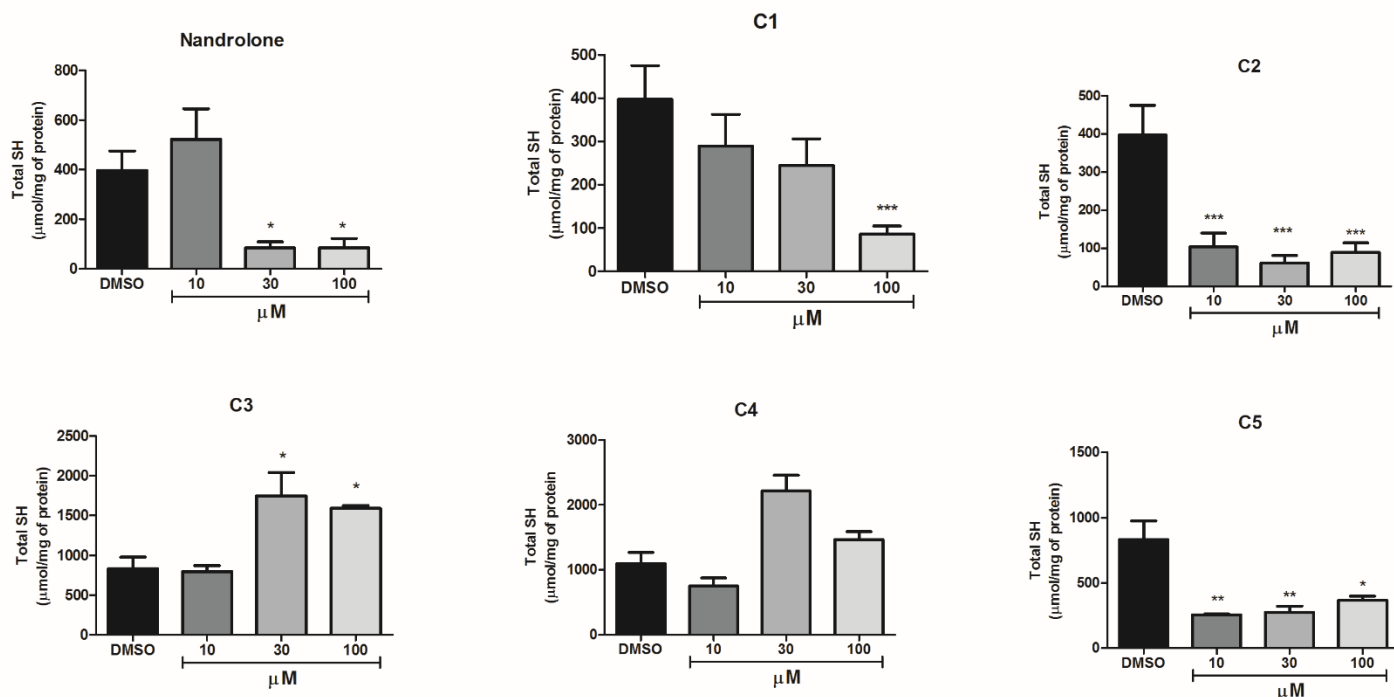


Figure 9 - Total thiol (SH) content in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μM) for 48 h. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

SOD 48h

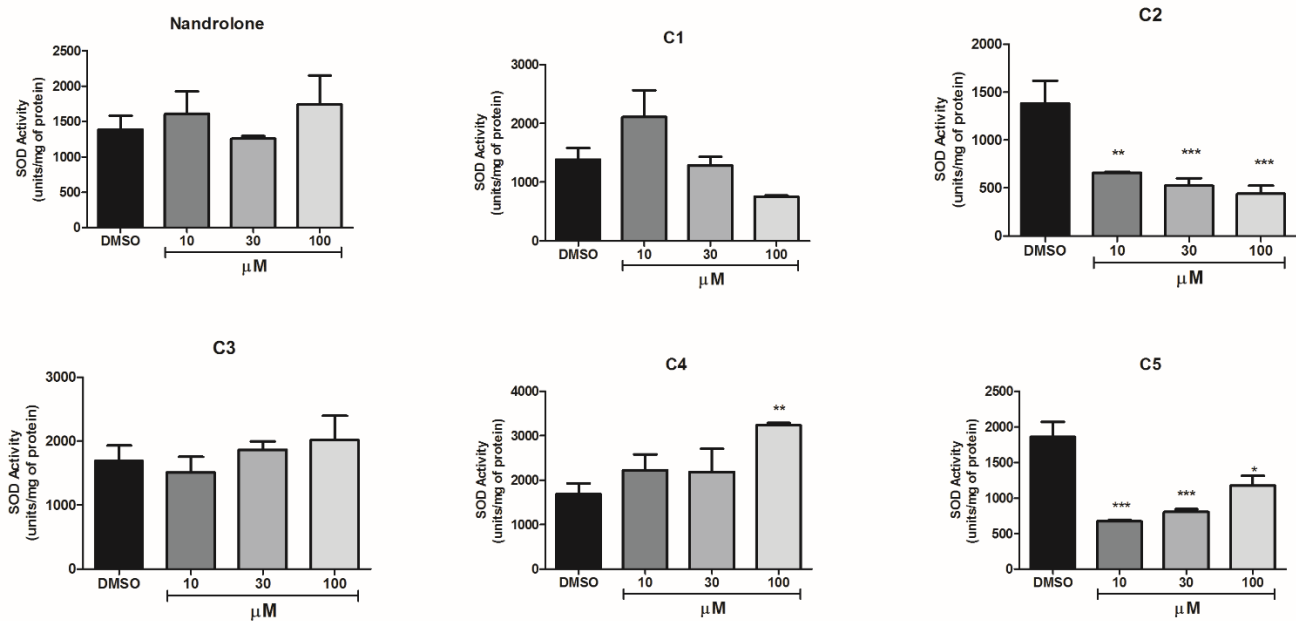


Figure 10 - Superoxide dismutase (SOD) activity in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μ M) for 48 h. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; differences compared to control cells (DMSO group).

Catalase 48h

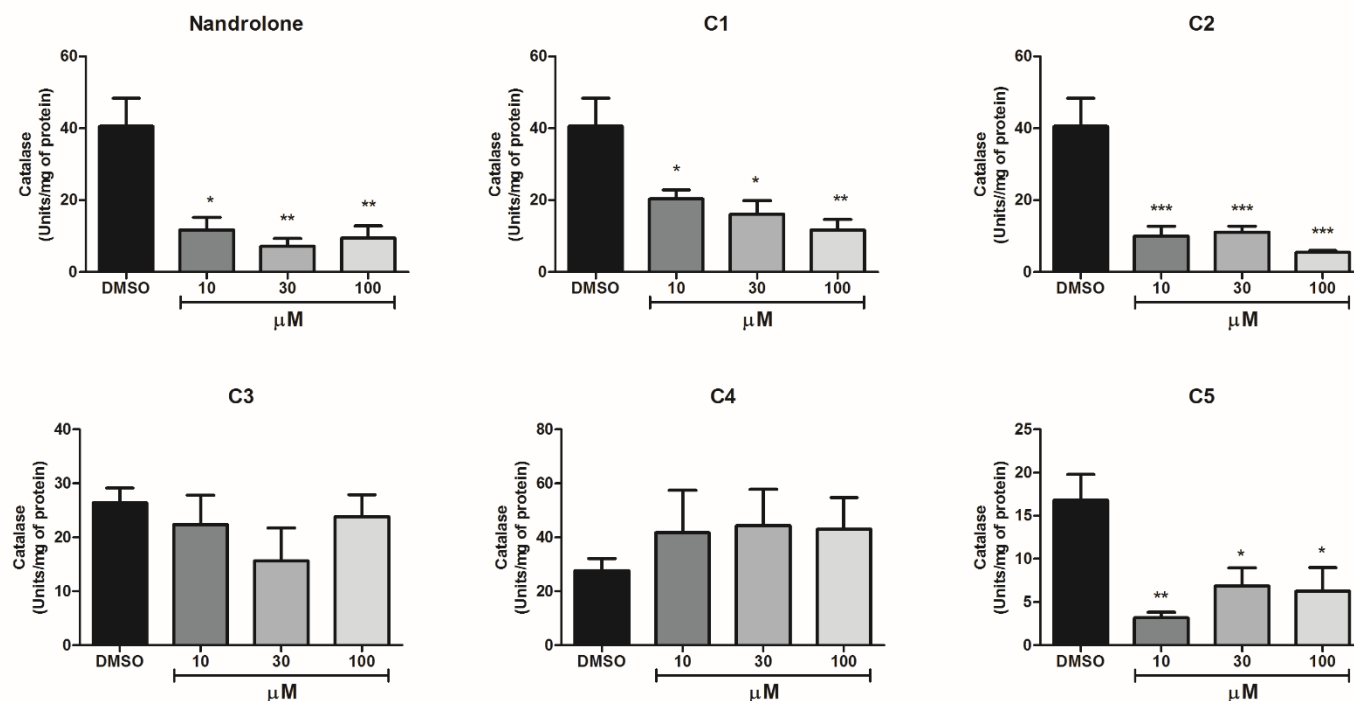


Figure 11 - Catalase (CAT) activity in primary astrocyte cultures exposed to nandrolone decanoate (Nandrolone), C1, C2, C3, C4, or C5 (10, 30, and 100 μ M) for 48 h. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001; differences compared to control cells (DMSO group).

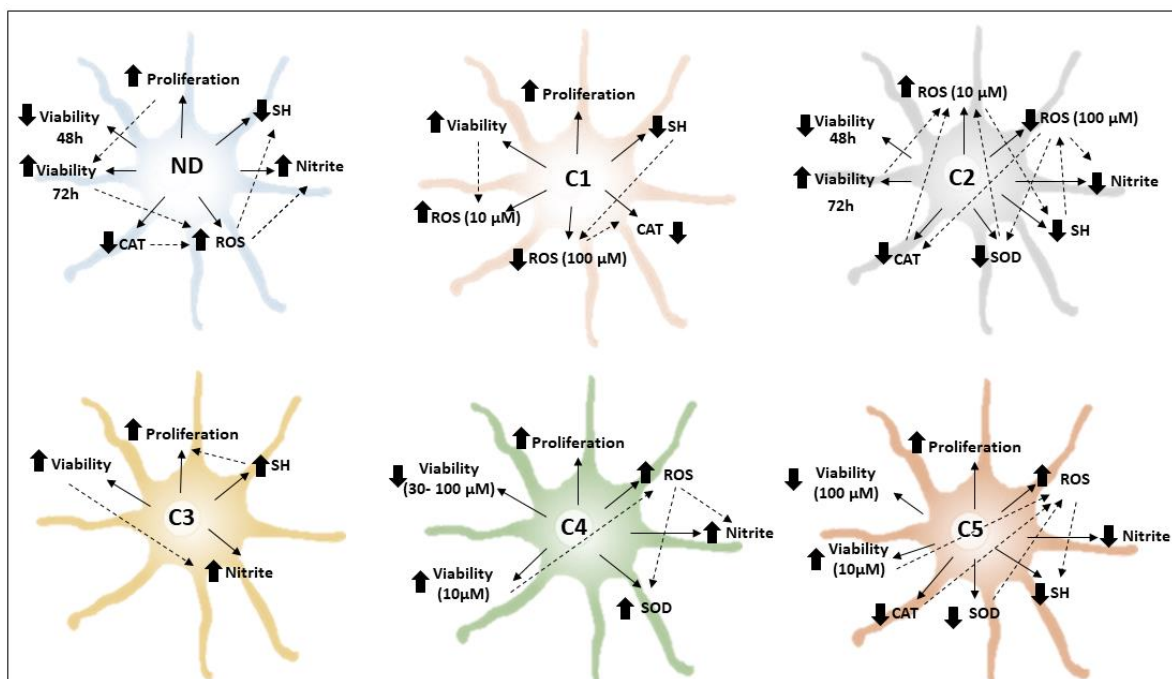


Figure 12 - Overview of the effects of different AAS formulations on viability, proliferation, and redox status in primary astrocyte culture. Solid lines represent results obtained in the analysis, while dashed lines represent what these results may have influenced.

5. Discussão

Esteroides anabolizantes androgênicos são substâncias sintéticas da testosterona, inicialmente teve o intuito terapêutico, como o tratamento do hipogonadismo (BERNEIRA et al., 2019). Porém essas substâncias são conhecidas pelo uso ilícito por atletas profissionais ou recreativos, já que esses provocam um aumento na performance esportiva e desenvolvimento muscular (WEBER et al., 2017).

O risco do consumo inadequado desses anabolizantes, levou a um controle e proibição dessas substâncias (REBIERE et al., 2016). Contudo o aumento no número de apreensões dessas substâncias no Brasil aumenta a cada ano, juntamente com o número de falsificações que são encontradas nesses produtos apreendidos. Esses produtos apreendidos podem intensificar os danos causados pelo seu consumo aos usuários, já que são produzidas sem o devido controle de qualidade e em condições sanitárias inadequadas (NEVES et al., 2016; BERNEIRA et al., 2019). O consumo inadequado desses anabolizantes pode levar a uma série de efeitos adversos, como desenvolvimento de tumores no fígado, danos no sistema cardiovascular e danos físicos (HULLSTEIN et al., 2015). Dados da literatura mostram que no SNC doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes causam alterações comportamentais e estão associadas a depressão, agressividade, depressão e problemas na memória (KICMAN, 2008; OBERLANDER; HENDERSON, 2012; KOUVELAS et al., 2008; BERTOZZI et al., 2018).

Com isso, nesse estudo foi avaliada a composição química e o efeito citotóxico em astrócitos de cinco formulações (denominadas neste estudo de C1, C2, C3, C4 e C5) de esteroides anabolizantes apreendidos pela Polícia Federal Brasileira. Na análise através do CG-EM foi possível observar que das três formulações que apresentavam informações no rótulo nenhuma delas possui o princípio declarado. Além disso, duas formulações não apresentavam rótulo e foi identificado o princípio ativo. De acordo com a análise de CG-EM foi identificado nas amostras C1, C2 e C3 a presença do decanoato de nandrolona, enquanto a amostra C4 apresentava além da nandrolona, o propionato de testosterona e cipionato de testosterona. A amostra C5 não apresentou nenhum princípio ativo na sua composição, apenas excipientes.

Estes resultados estão de acordos com outros estudos da literatura. Fabresse e colaboradores mostram que de 40 formulações de esteroides anabolizantes apreendidos, 52% não apresentavam o princípio ativo ou este estava em uma concentração diferente do que aquela descrita no rótulo (FABRESSE et al., 2021). Resultados similares também foram descritos em estudo onde foi analisada formulações de EAAs apreendidas pela Polícia Federal utilizando inspeção visual e análise instrumental de Espectroscopia de Infravermelho, CG-EM e calorimetria de varredura diferencial (BERNEIRA et al., 2019). Esses dados são preocupantes pois o uso dessas formulações falsificadas pode causar efeitos indesejados ou tóxicos aos usuários uma vez que o seu processo de fabricação não atende ao controle de qualidade e as diretrizes sanitárias adequadas.

O decanoato de nandrolona é um dos EAAs mais utilizado mundialmente e estudos tem demonstrado efeitos neurotóxicos associados ao uso abusivo deste EAAs; tais como o comportamento agressivo e comprometimento da função de memória (BUSARDÒ et al., 2015). Considerando que a análise de CG-EM identificou presença do decanoato de nandrolona em quatro amostras de EAAS da Polícia Federal; neste estudo, foi utilizado também uma formulação comercial de decanoato de nandrolona como controle.

Os resultados demonstraram que a formulação comercial da nandrolona causou um aumento na viabilidade e proliferação celular na cultura de astrócitos na concentração de 10 μ M, já nas concentrações de 30 e 100 μ M causaram uma diminuição nestes parâmetros quando comparados as células controle. Estudos publicados anteriormente mostram que a exposição repetida a nandrolona nas concentrações de 30 e 100 μ M também diminuíram a viabilidade celular em culturas corticais primárias sendo essa diminuição associada à apoptose mediado pela ativação do receptor androgênico (ZELLEROTH et al., 2019). Um estudo realizado por Pomara e colaboradores também corrobora com a hipótese de que a apoptose e o estresse oxidativo são mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida por nandrolona (POMARA et al., 2015).

A formulação comercial de nandrolona também foi capaz de aumentar os níveis de ROS e nitrito, enquanto os níveis de SH e catalase foram diminuídos, consequentemente levando a um aumento de H_2O_2 . Essas alterações podem estar associadas ao efeito gliotóxico causado pela nandrolona, já que estudos mostram que o excesso de H_2O_2 causa alterações no citoesqueleto e no metabolismo de astrócitos,

ocasionando disfunção nas células (TURILLAZZI et al., 2016). Outros estudos também mostram os efeitos induzidos pela nandrolona com danos oxidativos em diversas regiões do cérebro de ratos (EL-SHAMARKA et al., 2020).

O aumento dos níveis de ROS nos astrócitos tratados com a nandrolona pode ser explicado através da disfunção mitocondrial, já que a mitocôndria é a principal fonte de radicais livres, correlacionando à diminuição da catalase e SH que são defesas antioxidantes. O aumento dos níveis de nitrito pode causar a formação do peróxido de nitrito, sendo essa uma espécie reativa extremamente prejudicial às células (ALEYNIK et al., 1998).

Na análise citotóxica realizada com as cinco formulações apreendidas pela Polícia Federal os compostos C1 e C2 tiveram resultados similares em relação a proliferação e viabilidade celular e níveis de ROS quando comparados a formulação comercial da nandrolona. Já nos níveis de nitrito, teor de SH e atividades da SOD e CAT o composto C2 apresentou uma diminuição em todas as concentrações avaliadas. Por fim a amostra C5 que não possuía nenhum princípio ativo na sua formulação causou alterações nos parâmetros de estresse oxidativo das células. Esses resultados demonstram que além do risco causado por doses supra fisiológicas de EAAs há um risco maior para os usuários o consumo dessas formulações adulteradas, já que a ausência de qualidade e pureza no produto pode levar a uma formulação capaz de induzir efeitos tóxicos mais potentes em órgãos, incluindo o SNC.

Pode-se observar através dos resultados desse estudo que a nandrolona comercial e os EAAs apreendidos pela Polícia Federal induziram efeito tóxico em cultura primária de astrócitos, podendo esses efeitos estarem associados ao dano oxidativo. Além disso, a disfunção dos astrócitos pode contribuir para danos cerebrais associados ao uso abusivo de EAAs. Adicionalmente, os resultados obtidos através da análise cromatográfica dos EAAs utilizados neste estudo, sugerem o risco que os usuários correm ao comprar e fazer uso de forma ilícita, já que três formulações que possuíam rótulo apresentaram uma composição diferente da descrita; e as outras duas amostras não possuíam rótulo descrevendo sua composição.

O uso de formulações ilícitas também pode aumentar os efeitos neurotóxicos causados pelo consumo de EAAs, já que a sua composição é incerta e não há controle de qualidade. Porém ainda são necessários mais estudos para elucidar os

mecanismos envolvidos nos efeitos gliotóxicos causados pelos EAAs, incluindo o decanoato de nandrolona.

6. Conclusões

- A análise química demonstrou que nas amostras de EAAs apreendidas pela Polícia Federal ocorreu diferenças em relação a presença da substância ativa com as informações descritas no rótulo. Esses dados são preocupantes uma vez que o uso dessas formulações falsificadas pode causar efeitos indesejados ou tóxicos aos usuários já que esses produtos não possuem garantia de controle de qualidade e muitas vezes, nem condições sanitárias adequadas para a sua produção.
- A formulação comercial de decanoato de nandrolona alterou a proliferação e viabilidade de astrócitos e induziu estresse oxidativo nestas células. Esses dados corroboram com a literatura sobre os efeitos neurotóxicos da nandrolona. Além disso, alterações astrocitárias podem aumentar a liberação de espécies reativas ou de fatores pró-inflamatórios contribuindo para o dano cerebral.
- As formulações de EAAs apreendidas pela Polícia Federal tiveram resultados similares na viabilidade, proliferação e estresse oxidativo em astrócitos em relação a formulação comercial de decanoato de nandrolona, possivelmente, isso pode ser devido ao fato de que a maioria delas possuía este princípio ativo na sua composição. Entretanto os efeitos mais pronunciados em relação ao estresse oxidativo foram observados para a formulação C2 e a formulação C5 (a qual não foi detectada nenhum princípio ativo). Esse resultado pode ser atribuído a diferentes concentrações do princípio ativo e aos excipientes que compõem a formulação.

7. Referências

ALBANO, G. D. et al. Adverse Effects of Anabolic-Androgenic Steroids: A Literature Review. **Healthcare**, v. 9 (1), p. 91, 2021.

ALEYNIK, S. I. et al., Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver diseases. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 192-196, 1998.

ARAZI, H.; MOHAMMADJAFARI, H.; ASADI, A. Use of anabolic androgenic steroids produces greater oxidative stress responses to resistance exercise in strength-trained men. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 282-286, 2017.

BAGATELL, C. J.; BREMNER, W. J. Androgens um men-Uses and abuses. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 707-714, 1996.

BARCELOUX, D. G.; PALMER, R. B. Anabolic – Androgenic Steroids. **Disease-a-Month**, v. 59, p. 226-248, 2013.

BASARIA S.; WAHLSTROM, J.; DOBS, A. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 5108-5117, 2001.

BASILE, J. R. et al. Supraphysiological doses of performance enhancing anabolic androgenic steroids exert direct toxic effects on neuron-like cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. APR, p. 1-10, 2013.

BERNEIRA, L. M. et al. Application of differential scanning calorimetry in the analysis of apprehended formulations of anabolic androgenic steroids. **Forensic Science International**, v. 296, p. 15-21, 2019.

BERTOZZI G. et al., The role of anabolic androgenic steroids in disruption of the physiological function in discrete areas of the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 55, p. 5548-5556, 2018.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**. [s.l.] Senado Federal: Centro Gráfico, 1988.

BUSARDÒ, F. et al. The Impact of Nandrolone Decanoate on the Central Nervous System. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 122-131, 2015.

CARACI, F. et al., Neurotoxic properties of the anabolic androgenic steroids nandrolone and methandrostenolone in primary neuronal cultures. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, 2011.

CELOTTI, F.; CESI, P. N. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n.5, p. 469-477, 1992.

CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27(5), p. 413-436. 2003.

COOPMAN, V.; CORDONNIER, J. Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders. **Annales de Toxicologie Analytique**, v.24, p. 73–80, 2012.

CUNHA, T. S. et al., Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40 (2), 2004.

DAVEY, R. A.; GROSSMANN, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 31(1), p. 3-15, 2016.

EL-SHAMARKA, M. E. S. et al., Combined neurotoxic effects of cannabis and nandrolone decanoate in adolescent male rats. **Neurotoxicology**, v. 76, p. 114-125.

EVANS, N. A. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 534-543. 2004.

FABRESSE, N. et al. Analysis of pharmaceutical products and dietary supplements seized from the black market among bodybuilders. **Forensic Science International**, v. 322, 110771.

FERRANDO A. A. et al. Testosterone administration in severe burns ameliorates muscle catabolism. **Critical Care Medicine**, v. 29, p. 1936 – 1942, 2001.

FRANKENFELD, S. P. et al., The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats. **Plos one**, v. 16, n.9, 2014.

GARCÍA M. et al. Leydig cell tumour: Enucleation as a therapeutic choice in a case with atypical symptoms. **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 65, p. 897-899, 2012.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140(6), p. 18-934, 2010.

GOMES, F. G. N. et al. The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 50, p.106–117, 2014.

HALL, C. W. R.; HALL, C. W. R.; CHAMPMAN, M. J. Psychiatric Complications of Anabolic Steroid Abuse. **Psychosomatics**, v. 46(4), p. 285-290, 2005.

HULLSTEIN I. R. et al. Black market products confiscated in Norway 2011-2014 compared to analytical findings in urine samples. **Drug testing and analysis**, v. 7, p. 11-12, 2015.

HENDERSON, L. P. et al., Anabolic Androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. **Neuroscience**, v. 138 (3), p. 793-799, 2006.

JOKSIMOVIC, J. Exercise Attenuates Anabolic Steroids-Induced Anxiety via Hippocampal NPY and MC4 Receptor in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p.172, 2019.

KADI, F. et al., The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 113, p. 25-29, 2000.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse: A looming public health concern? **Drug Alcohol Depend**, v. 98 (1-2), p. 1-12, 2008.

KARIMOY, F. N. et al. Neurotoxic Effects of Stanozolol on Male Rats' Hippocampo: Does Stanozolol cause apoptosis? **BioMolecular Concepts**, v. 10, p. 73-81, 2019.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 502-521, 2008.

KOUVELAS, D. et al. Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 925-34, 2008.

KRISHNA, M. C. et al. Do nitroxide antioxidants act a scavenger of superoxide or as superoxide dismutase mimics? **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 26026-26031, 1996.

KROLOW R. et al. Oxidative Imbalance and Anxiety Disorders. **Current Neuropsychopharmacology**, v. 12(2), p. 193-204, 2014.

KUHN, C. M. Anabolic Steroids, **Recent Progress in Hormone Research.**, Bethesda, v. 57, p. 411-434, 2002.

KUTSCHER, E. C.; LUND, B. C.; PERRY, P. J. Anabolic steroids: A review for the clinician. **Sports Medicine.**, v. 32 (5), p. 285-296, 2002.

LIEBER, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism, **Clinical Chemical Acta**, v. 257, p. 59-84, 1997.

LLEWELLYN, W. Anabolics, **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 193-194, p. 402-412, 2011.

MAYER, M.; ROSEN, F. Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. **American Physiological Society Journal**, v. 229, p. 1381-1386, 1975.

McCORD, J. M. Human disease, free radical, and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 351-357, 1993.

MESMER, M.; SATZGER, R. Determination of anabolic steroids by HPLC with UV-Vis particle beam mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 35, p. 38-42, 1997.

MONDA, V. et al., Role of sex hormones in the control of vegetative and metabolic functions of middle-aged women. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 773, 2017.

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S. A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 26, p. 523-530, 2003.

NEVES, D. B. DA J.; MARCHETI, R. G. A.; CALDAS, E. D. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. **Forensic Science International**. v. 228, p. 81-83, 2013.

NEVES, D. et al. Detection of Counterfeit Durateston Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares – Discriminant Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n.7, p. 1288-1296, 2016.

NEVES, D. B. DA J.; CALDAS, E. D. GC–MS Quantitative Analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Science International**, v. 275, p. 272–281, 2017.

NIKOLIC, T. et al. The effects of chronic administration of nandrolone decanoate on redox status in exercised rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, 2015.

OBERLANDER, J. G.; HENDERSON, L. P. The Sturm und Drang of anabolic steroid use: angst, anxiety and aggression. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n.6, p. 382-392, 2012.

OUYANG, Y. B. et al. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 4253-4260, 2007.

PATANÉ, F. G. et al., Nandrolone Decanoate: Use, Abuse and Side Effects. **Medicina**, v. 56, p. 606, 2020.

POMARA, C. et al. Neurotoxicity by Synthetic Androgen Steroids: Oxidative Stress, Apoptosis, and Neuropathology: A Review. **Current Neuropharmacology**, v. 13, p. 132-145, 2015.

PROKUDINA, E. A. et al. Analysis of anabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p. 28-33, 2015.

PUNTARULO, S.; STOYANOVSKY, D. A.; CEDERBAUM, A. I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 15, p. 355-359, 1999.

QUAGLIO G. et al., Anabolic steroids: Dependence and complications of chronic use. **Internal and Emergency Medicine**, v. 4, p. 289-296, 2009.

RAMOS-PRATTS, K. et al. Sex-specific effects of the anabolic steroid 17 α -methyltestosterone on inhibitory avoidance learning in periadolescent rats. **Behavioural Processes**, v. 99, p. 73-80, 2013.

RAMMAL, H. et al. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n.8, p. 1156-9, 2008.

RAO, T. S.; WILLINGHAM, K. D. L.; YU, N. Glutamate-dependent glutamine, aspartate and serine release from rat cortical glial cell cultures. **Brain Research**, v.978, n.1-2, p.213-22, 2003.

REBIERE, H. et al. Investigation of the composition of anabolic tablets using near infrared spectroscopy and Raman chemical imaging. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, p. 370-377, 2016.

REYES-VALLEJO, L. Uso y abuso de agentes anabolizantes em la actualidad. **Actas Urológicas Españolas**. v. 44, p. 309-313, 2019.

SAGOE, D. et al. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 24, p. 383-398, 2014.

SCACCIANOCE, S. et al. Potential neurodegenerative effect of anabolic androgenic steroid abuse. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, n. 2, p. 107-114, 2013.

SHENG, W. S. et al. Reactive Oxygen Species from Human Astrocytes Induced Functional Impairment and Oxidative Damage. **Neurochemical Research**, v. 38, n.10, p. 2148-2159, 2013.

SILVERTHORN, D. U. **Human Physiology: An Integrated Approach**. 8ª Edição ed. [s.l.] Pearson, 2019.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n.1, p. 7-35, 2010.

SOFRONIEW, M. V. Astrogliosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n.2, a020420, 2015.

TURILLAZZI, E. et al. Lipid peroxidation and apoptotic response in rat brain areas induced by long-term administration of nandrolone: the mutual crosstalk between ROS and NF- κ B. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V. 20, n. 4, p. 601-216, 2016.

WEBER, C. et al. Qualitative and Semiquantitative Analysis of Doping Products Seized at the Swiss Border. **Substance Use and Misuse**, v. 52, n. 6, p. 742-753, 2017.

WRIGHT T. J. et al. A randomized trial of adjunct testosterone for cancer-related muscle loss in men and women. **Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, p. 482-496, 2018.

ZELLEROTH, S. et al. Toxic Impact of Anabolic Androgenic Steroids in Primary Rat Cortical Cell Cultures. **Neuroscience**, v. 397, p. 172-183, 2019.

8. Anexos

08/10/2021 14:51

SEI/UFPel - 1456790 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

118/2021/CEUA/REITORIA
23110.023368/2021-37

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de formulações de esteroides anabolizantes em cultura primária de astróceitos", registrada com o nº 23110.023368/2021-37, sob a responsabilidade de **Roselia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de oito de outubro de 2021.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início = 10/11/2021 Término = 01/09/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	15
Idade	1-3 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEUA 023368/2021-37

Priscila Marques Moura de Leon
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON**, Professor do Magistério Superior/Adjunto, em 08/10/2021, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1456790** e o código CRC **98E3B793**.

Referência: Processo nº 23110.023368/2021-37

SEI nº 1456790

Anexo A: Carta de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.