

EFEITOS DOS ANABOLIZANTES SOBRE A DENSIDADE DE NEURÔNIOS DOS NÚCLEOS DA BASE



ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

EFFECTS OF ANABOLIC AGENTS ON THE NEURON DENSITY OF THE BASAL NUCLEI

EFFECTOS DE LOS ANABOLIZANTES EN LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS DE LOS NÚCLEOS BASALES

Ariane Cristine de Freitas¹ (Bióloga)
Bruno Damião¹ (Biomédico)
Débora Mantoan Alves¹ (Biomédica)
Melissa Ribeiro¹ (Dentista)
Geraldo José Medeiros Fernandes¹ (Médico)
Wagner Costa Rossi Junior¹ (Dentista)
Alessandra Esteves¹ (Médica Veterinária).

Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Alfenas, MG, Brasil.

Correspondência:

Alessandra Esteves
Departamento de Anatomia,
Universidade Federal de Alfenas.
Rua Gabriel Monteiro da Silva,
700, Centro, Alfenas, MG, Brasil.
37130-000.
aesteves@unifal-mg.edu.br

RESUMO

Objetivos: Pouco se sabe sobre a atuação dos esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) no cérebro humano e, por isso, resolvemos estudar a perda neuronal causada pelo uso e abuso de EAA em camundongos. **Métodos:** Utilizamos 60 camundongos da linhagem Swiss, sendo 30 machos e 30 fêmeas, divididos em três grupos: 20 animais foram tratados com Deposteron[®] (cipionato de testosterona); outros 20 animais foram tratados com Winstrol Depot[®] (stanozolol); os últimos 20 animais foram tratados com solução salina. Todos foram submetidos à natação por 15 minutos. Finalizado o tratamento, os animais foram sacrificados pelo método de inalação de Halotano. Os encéfalos foram retirados e armazenados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas. De cada encéfalo foram retiradas amostras homotípicas da região média do cérebro em cortes frontais para que pudéssemos avaliar as áreas estabelecidas para este estudo. **Resultados:** As análises da estimativa dos perfis celulares mostraram que houve uma diminuição do número de perfis no núcleo pálido dos animais machos tratados com Winstrol Depot[®]. **Conclusão:** Esses resultados nos permitem inferir que o uso inadequado e sem orientação médica de EAA pode levar a degenerações celulares.

Descritores: anabolizantes; neurônios; gânglios da base; corpo estriado; globo pálido.

ABSTRACT

Objectives: Little is known about the action of anabolic-androgenic steroids (AAS) on the human brain and, therefore, we decided to study the neuronal loss caused by use and abuse of AAS in mice. **Methods:** We used 60 Swiss mice, 30 males and 30 females, divided into three groups: 20 animals treated with Deposteron[®] (testosterone cypionate); another 20 animals were treated with Winstrol Depot[®] (stanozolol); the last 20 animals were treated with saline solution. All the animals were submitted to swimming for 15 minutes. After the treatment, the animals were euthanized by halothane inhalation (Halotano) method. The brains were removed and stored in 4% formaldehyde solution for 24 hours. From each brain, homotypic samples were taken from the middle region of the brain in frontal cuts so that we could evaluate the areas established for this study. **Results:** Analyzes of the estimated cell profiles showed that there was a decrease in the number of profiles in the pallidal nucleus of the male animals treated with Winstrol Depot[®]. **Conclusion:** These results allow us to infer that inadequate and non-medical use of AAS can lead to cellular degeneration.

Keywords: anabolic agents; neurons; basal ganglia; corpus striatum; globus pallidus.

RESUMEN

Objetivos: Poco se sabe acerca del efecto de la acción de los esteroides anabólicos androgénicos (EAA) en el cerebro humano y, por este motivo, decidimos estudiar la pérdida neuronal causada por el uso y abuso de EAA en ratones. **Métodos:** Utilizamos 60 ratones de linaje Swiss, siendo 30 machos y 30 hembras, divididos en tres grupos: 20 animales fueron tratados con Deposteron[®] (cipionato de testosterona); otros 20 animales fueron tratados con Winstrol Depot[®] (stanozolol); los últimos 20 animales fueron tratados con solución salina. Todos fueron sometidos a natación durante 15 minutos. Terminado el tratamiento, los animales fueron sacrificados por el método de inhalación de Halotano. Los cerebros fueron retirados y almacenados en solución de formaldehído al 4% durante 24 horas. De cada cerebro fueron retiradas muestras homotípicas de la región media del cerebro en cortes frontales, así que pudimos evaluar las áreas establecidas para este estudio. **Resultados:** El análisis de la estimación de los perfiles celulares mostró que hubo una disminución en el número de perfiles en el globo pálido de los animales machos tratados con Winstrol Depot[®]. **Conclusión:** Estos resultados permiten inferir que el uso inadecuado y sin orientación médica de EAA puede conducir a la degeneración celular.

Descriptorios: anabolizantes; neuronas; ganglios basales; cuerpo estriado; globo pálido.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas essas substâncias vêm sendo utilizadas por atletas de elite, em maior parte, aqueles envolvidos em esportes de força e velocidade, para melhora do desempenho físico nas competições. Entretanto, o abuso dos EAA passou a ser feito por frequentadores de academias, mais interessados nas alterações provocadas na composição corporal, observados com o aumento da massa magra e na redução da gordura subcutânea¹.

Os neurônios do complexo estriado são, em sua maioria, denominados neurônios ou células espinhosas médias, devido ao seu tamanho moderado e ao grande número de espinhas ou espículas dendríticas que, em geral, alcançam apenas a região onde se localiza o corpo celular. Seus axônios formam as únicas fibras eferentes do neostriado e têm como principal neurotransmissor inibidor o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA), mas podem conter outros (também inibidores), em especial neuropeptídeos, como a substância P e a encefalina. Os neurônios do paleostriado ou pallidum (núcleo pálido) são essencialmente GABAérgicos (inibidores) e disparam espontaneamente, inibindo tonicamente (continuamente) as suas células-alvo. As duas partes do globo pálido estão reciprocamente conectadas (fibras pálido-palidais), mas se prestam a diferentes funções. As principais aferências ao paleostriado são axônios das células espinhosas médias do neostriado (fibras estriado-palidais) de dois tipos: os que se projetam ao pálido-interno (e também à substância negra) e contêm os neurotransmissores GABA e substância P e os que chegam ao pálido-externo e contêm GABA e encefalina².

Na Medicina, os EAA são utilizados geralmente no tratamento de sarcopenias, hipogonadismo, câncer de mama e da osteoporose. Nos esportes, são utilizados para o aumento da força física e da massa muscular; entretanto, os efeitos sobre o desempenho atlético permanecem, ainda, controversos³.

Mello et al.⁴ encontraram em seus estudos que o uso abusivo dos EAA pode acarretar o aparecimento de efeitos colaterais reversíveis e irreversíveis, na maioria dos sistemas do organismo (fígado, sistema cardiovascular e endócrino). Dentre esses efeitos podem ocorrer danos no tecido hepático, atrofia de testículos, hipertrofia de clitório e, em alguns casos, podem chegar à hipertensão arterial e à hipertrofia ventricular esquerda.

O uso abusivo de EAA é baseado em doses supra-fisiológicas que são de 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas, e isso tem sido associado a um amplo espectro de efeitos adversos físicos e psíquicos. Pouco se sabe sobre a atuação dos EAA no cérebro humano, havendo relatos de alterações no comportamento agressivo, ansiedade e depressão, segundo relatos de Ambar e Chiavegatto⁵, Pope e Katz⁶ e Schulte et al.⁷

Recentes modelos animais demonstraram que o uso crônico e o abuso de EAA (stanozolol) reduzem os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro e dopamina no hipocampo e córtex pré-frontal. Além da redução na expressão dos receptores de glucocorticóides no hipocampo e no plasma e aumento dos níveis basais matinais de cortisol plasmático. Estas alterações metabólicas têm sido relacionadas a distúrbios do humor, como a depressão^{8,9}.

Alguns estudos^{10,11} investigaram mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de EAA em roedores. O uso crônico de EAA em camundongos mostrou-se indutor de mudanças no nível de fator neurotrófico derivados do cérebro, dependentes de dose, sexo e idade na expressão gênica da subunidade do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico.

Após conhecer a estrutura e a função dos núcleos da base, a relação desta estrutura com os esteroides anabolizantes, o crescente uso indevido de substâncias anabolizantes, além da escassez de estudos para elucidar

os efeitos deletérios do uso de tais substâncias, quando utilizadas sem o devido acompanhamento médico, achamos por bem estudar quais os efeitos de tais substâncias nos corpos celulares de neurônios dos animais usados neste experimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-Unifal-MG) sob registro nº 414/2012. Sessenta camundongos da linhagem Swiss, com idade aproximada de 90 dias (jovens-adultos), peso corpóreo entre 40 e 50 gramas, sendo 30 machos e 30 fêmeas, foram alojados em caixas contendo cinco animais cada, tratados com ração comercial e água "ad libitum" e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro.

O tratamento consistiu na aplicação, por via intraperitoneal (IP), de dois esteroides anabolizantes: o primeiro, comercializado com o nome de Deposteron® (Cipionato de Testosterona) e o segundo, comercializado pelo nome de Winstrol Depot® (stanozolol), nas doses conforme Quadro 1. Os animais foram tratados durante um mês, com aplicações realizadas duas vezes por semana (nas terças e quintas feiras). As doses utilizadas nos animais foram baseadas na quantidade de EAAs utilizada pelos usuários frequentadores de academias da cidade de Alfenas e, para isso, utilizamos o método de Extrapolação Alométrica¹².

Nas quartas e sextas feiras, durante os 30 dias de tratamento, os animais foram submetidos à natação por 15 minutos, realizado em um recipiente medindo 43x34x26cm e contendo no seu interior água, na temperatura de 24-26°C até a borda.

Quadro 1. Grupo de animais de acordo com EAA e a dosagem utilizada.

Grupos	Número de Animais	EAA	Dosagem
Grupo 1	10 machos 10 fêmeas	Deposteron® (Cipionato de Testosterona)	0,8mg/kg /dia
Grupo 2	10 machos 10 fêmeas	Winstrol Depot® (Stanozolol)	1,8mg/kg /dia
Grupo 3	10 machos 10 fêmeas	grupo controle (solução salina)	1,8mg/kg /dia

Coleta das amostras

Após o tratamento os animais foram eutanasiados através da inalação de Halotano e retirados os encéfalos com o auxílio de um alicate. Estes foram então armazenados em recipientes de vidro contendo formaldeído a 4% pH 7,4 0,1M, permaneceram imersos nesta solução fixadora por 24 horas, seguindo o protocolo utilizado por Rabinowiz et al.¹³. Em cada encéfalo foram retiradas amostras homotípicas da região média do cérebro em cortes frontais¹⁴ para que possamos avaliar as áreas então estabelecidas para este estudo.

Os fragmentos foram processados seguindo-se a sequência padronizada nos procedimentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cada amostra com as referidas áreas a serem analisadas de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin¹⁵, foi emblocada e cortada com espessura de 7µm em microtomo Lupe® e coradas com violeta cresil para facilitar a visualização dos Corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar marcar fortemente e individualmente cada célula para posterior contagem.

Para a estimativa da densidade por área dos perfis de corpos celulares de neurônios utilizamos a metodologia de contagem aleatória simples¹⁶⁻²⁰. Neste método adquirimos dois campos microscópicos aleatórios de três cortes semi seriados da área, totalizando assim seis (6) áreas analisadas por animal. Nestas áreas marcamos somente os perfis dos corpos celulares de neurônios que se encontram dispostos dentro da área teste (counting frame). Desta forma, aferimos o número de células por área contada, e não o número total dessas células nos Núcleo Estriado e Núcleo.

Esta análise foi feita com o auxílio de um Sistema Analisador de Imagens Axiovision 4 Module Interactive Mensuerement da marca Carl Zeiss® acoplado a um microscópio Axio Scope A1 da marca Carl Zeiss® e um computador.

Análise estatística

O estudo representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Tukey. Para tal análise utilizou-se o Programa GraphPad Prism 5. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS

De acordo com os resultados obtidos, conforme demonstra a Figura 1, pode-se observar que não houve diferenças significativas do número de perfis neuronais no Núcleo Estriado de machos (Figura 1A), sendo a média do número de perfis dos grupos: Controle (33,7), Deposteron® (32,5) e Winstrol® (34,7); no Núcleo Estriado de fêmeas (Figura 1B), com a média do número de perfis dos grupos: Controle (37,5), Deposteron® (33,3) e Winstrol® (33,2); e no Núcleo Pálido de fêmeas (Figura 1C), sendo que a média do número obtido de perfis celulares são: Controle (16), Deposteron® (15,4) e Winstrol® (13,8); quando comparados os grupos experimentais com o grupo controle.

Entretanto pode-se observar uma diminuição estatisticamente significativa no número de perfis neurais no Núcleo Pálido dos animais machos tratados, demonstrado na Figura 2, sendo que as médias do número obtido de perfis celulares são: Controle (23,2), Deposteron® (21) e Winstrol® (13).

DISCUSSÃO

Pode-se observar, após análise quantitativa que houve uma diminuição estatisticamente significativa no número de perfis neurais no Núcleo Pálido dos animais machos tratados com Winstrol®, comparados aos animais controle. Esse resultado se assemelha ao encontrado por Damiano et al.²¹, que demonstrou uma diminuição significativa na quantidade de corpos celulares de neurônios no córtex cerebral de camundongos tratados com esteroides anabolizantes, quando comparados com o grupo controle; e Kalinine²² cujos estudos demonstram que os esteroides anabolizantes podem ter atividade deletéria sobre o SNC de humanos, se manifestando por alterações morfológicas, funcionais e comportamentais.

Cinco conceitos são fundamentais para a compreensão anatômica e funcional dos Núcleos da Base: a) suas lesões não resultam em paralisias, mas sim em disfunção dos movimentos e também podem causar déficits significativos cognitivos e de percepção; b) anatômica e funcionalmente, são agrupados em circuitos que processam diferentes tipos de informação; c) eles funcionam primariamente através de desinibições; d) suas patologias podem resultar de disfunções das interações neuroquímicas entre os seus componentes e dependem não apenas de neurotransmissores, mas também de receptores, da localização das sinapses e de outros fatores que atuam nos seus neurônios; e) eles integram circuitos paralelos que seguem o trajeto *Córtex Cerebral – Núcleos da Base – Tálamo – Córtex Cerebral*².

Acompanhando o terceiro conceito citado a cima por Haines², outros autores^{8,9} demonstraram que recentes modelos animais tratados com uso crônico e abusivo de esteroide anabolizante (stanozolol) reduziram os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é uma proteína endógena responsável por regular a sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica do sistema nervoso periférico e central, sendo que a redução dos níveis dessa substância levaria à morte neuronal e consequente diminuição do número de perfis neuronais, como relatado no presente estudo.

Alguns estudos^{10,11} também investigaram mecanismos moleculares cerebrais relacionados aos efeitos comportamentais de altas doses de

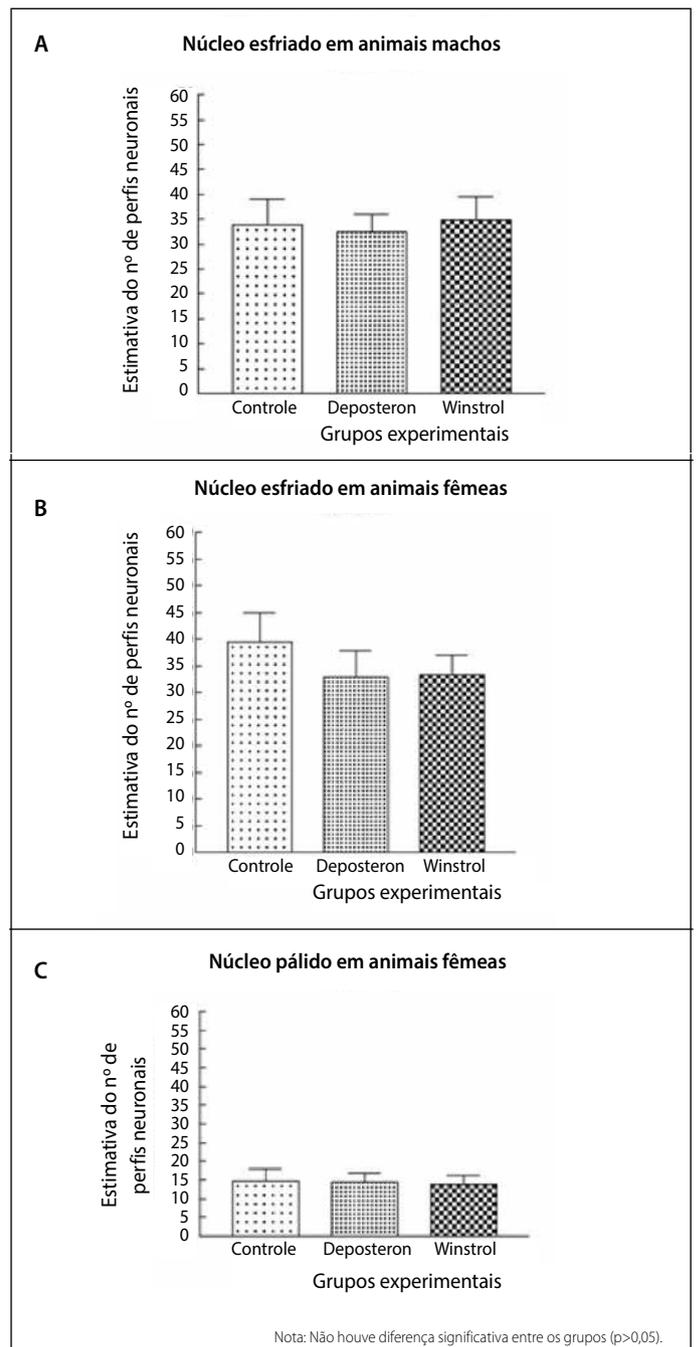


Figura 1. Gráficos comparativos da estimativa do número de perfis neurais no núcleo estriado nos animais machos e fêmeas e pálido nos animais fêmeas.

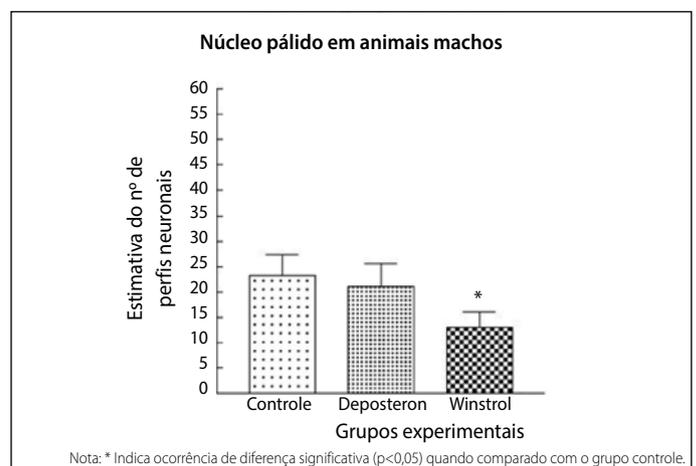


Figura 2. Gráfico comparativo da estimativa do número de perfis neurais no núcleo pálido.

esteroides anabolizantes em roedores. O uso crônico de EAA em camundongos mostrou-se indutor de mudanças na expressão gênica da subunidade do receptor GABA_A em áreas cerebrais anteriores, sugerindo o envolvimento do sistema inibitório GABAérgico. Essas mudanças na expressão gênica da subunidade do receptor poderia gerar a morte dos neurônios do Núcleo Pálido dos animais tratados, já que as células desse núcleo são essencialmente GABAérgicas².

Ballard e Wood²³ afirmam que existem três tipos principais de modificações da molécula de testosterona tais como: a hidroxilação na posição C-10 para aumentar a potência relativa (p.ex., nandrolona); esterificação para diminuir a taxa de inserção em circulação (por exemplo, cipionato de testosterona²⁴; e alquilação na posição C-17 para reduzir a primeira passagem do metabolismo no fígado, permitindo assim a administração oral, por exemplo, estanozolol²⁵⁻²⁷. Através disso podemos inferir que a ação do Winstrol® foi maior que a do Deposteron® devido ao processamento pelo qual o Winstrol® (Stanozolol) passou (alquilação na posição C-17), que permitiu a utilização desse por via oral. Porém, a administração do Winstrol® nesse experimento foi feita por meio IP, podendo ter sido mais eficaz pelo fato de não passar através do processo de digestão no estômago e, assim, ter sido maior e mais rápida a sua absorção pelo organismo.

As mais conhecidas funções dos Núcleos da Base estão associadas aos sistemas motores somático (circuito motor) e visual (circuito oculomotor). No entanto, ainda não está bem esclarecido o papel dos circuitos pré-frontal dorsolateral, órbito-frontal lateral e límbico nos distúrbios cognitivos e associativos. Portanto, a perda neuronal encontrada nesse estudo pode gerar alterações hipocinéticas ou hipocinesias, com redução dos movimentos, ou alterações hiperkinéticas ou hiperkinesias, com aumento dos movimentos.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo nos permitem concluir que houve uma diminuição significativa de perfis neuronais no Núcleo Pálido (43%) dos animais machos tratados com Winstrol Depot®.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a agência de fomento Fapemig pelo financiamento na publicação deste artigo.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento do manuscrito. ACF (0000-0003-0091-741X)* contribuiu com o tratamento dos animais e coleta das amostras, processamento histológico, análise das lâminas, análise dos dados e redação do artigo. BD (0000-0003-1732-7619)* contribuiu com o tratamento dos animais, coleta das amostras e processamento histológico. DMA (0000-0002-3779-6917)* e MR (0000-0002-8089-8943)* participaram da análise dos dados e estatística. GJMF (0000-0002-7633-3026)* contribuiu na revisão e tradução para a língua inglesa do manuscrito. WCRJ (0000-0003-1901-9978) contribuiu com a revisão e conceito intelectual do projeto de pesquisa. AE (0000-0001-6457-7050) contribuiu com o conceito intelectual do manuscrito, confecção de todo o projeto de pesquisa e orientação da pesquisa como professor pesquisador. *ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*).

REFERÊNCIAS

1. Venâncio DP, Nóbrega ACL, Tufik S, Mello MT. Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. *Rev Bras Med Esporte*. 2010;16(3):191-5.
2. Haines DE. *Fundamental of neuroscience*. New York: Churchill Livingstone; 1997.
3. Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteroides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8(6):235-43.
4. Mello MT, Boscolo RA, Esteves AM, Tufik S. O exercício físico e os aspectos psicobiológicos. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;11(3):203-7.
5. Ambar G, Chiavegatto S. Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. *Genes Brain Behav*. 2009;8(2):161-73.
6. Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry*. 1988;145(4):487-90.
7. Schulte HM, Hall MJ, Boyer M. Domestic violence associated with anabolic steroid abuse. *Am J Psychiatry*. 1993;150(2):348.
8. Talih F, Fattal O, Malone D Jr. Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. *Cleve Clin J Med*. 2007;74(5):341-4.
9. Tucci P, Morgese MG, Colaiana M, Zotti M, Schiavone S, Cuomo V, Trabace L. Neurochemical consequence of steroid abuse: stanozolol-induced monoaminergic changes. *Steroids*. 2012;77(3):269-75.
10. Clark AS, Costine BA, Jones BL, Kelton-Rehkopf MC, Meerts SH, Nutbrown-Greene LL, et al. Sex- and age-specific effects of anabolic androgenic steroids on reproductive behaviors and on GABAergic transmission in neuroendocrine control regions. *Brain Res*. 2006;1126(1):122-38.
11. Mcintyre KL, Porter DM, Henderson LP. Anabolic androgenic steroids induce age-, sex-, and dose-dependent changes in GABA_A receptor subunit mRNAs in the mouse forebrain. *Neuropharm*. 2002;43(4):634-45.
12. Mahmood I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(11):1177-92.
13. Rabinowicz T, Petetot JM, Gartside PS, Sheyn D, Sheyn T. Structure of the cerebral cortex in men and women. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(1):46-57.
14. Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(1):51-61.
15. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 2012.
16. Mandarim-de-Lacerda CA. *Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria e estereologia*. 2a. ed. Rio de Janeiro: CEBIO; 1994.
17. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Ciênc*. 2003;75(4):469-86.
18. Pakkenberg B, Gundersen HJ. Solutions to old problems in the quantitation of the central nervous system. *J Neurol Sci*. 1995;129(Suppl):65-7.
19. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*. 1993;14(4):275-85.
20. West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging*. 1993;14(4):287-93.
21. Damião B, Sousa GG, Nogueira DA, Rossi Jr WC, Fernandes GJM, Esteves A. Quantificação de corpos celulares de neurônios em camundongos submetidos a esteroides anabolizantes. *Rev Neuroci*. 2012;20(1):68-72.
22. Kalinine E. Efeitos Comportamentais, Neuroquímicos e Metabólicos do Tratamento com Decanoato de Nandrolona em Camundongos [dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica; 2011.
23. Ballard CL, Wood RL. Intracerebroventricular self-administration of commonly abused anabolic-androgenic steroids in male hamsters (*Mesocricetus auratus*): nandrolone, drostanolone, oxymetholone, and stanozolol. *Behav Neurosci*. 2005;119(3):752-8.
24. Pavlatos AM, Fultz O, Monberg MJ, Vootkur A, Pharmed. Review of oxymetholone: a 17alpha-alkylated anabolic-androgenic steroid. *Clin Ther*. 2001;23(6):789-801.
25. Gallaway S. *The steroid bible*. 3th ed. Honolulu, HI: Belle International; 2001.
26. Taylor WN. *Anabolic steroids and the athlete*. 2nd ed. Jefferson, NC: MacFarland; 2002.
27. Yesalis CE. *Anabolic steroids in sport and exercise*. Champaign, IL: Human Kinetics; 2000.