

VANESSA DE MORAES ROCHA

**EFEITO DO ESTERÓIDE ANABÓLICO NANDROLONA
SOBRE O NÍVEL DE ANSIEDADE EM RATOS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do Título
de Mestre em Odontologia, Área de concentração
em Fisiologia Oral.*

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Fernanda Klein Marcondes

PIRACICABA
2006

VANESSA DE MORAES ROCHA

**EFEITO DO ESTERÓIDE ANABÓLICO NANDROLONA
SOBRE O NÍVEL DE ANSIEDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Fisiologia Oral.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Fernanda Klein Marcondes

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a. Maria José Costa Sampaio Moura

Prof^o Dr. Luciano José Pereira

Prof^a Dr^a. Fernanda Klein Marcondes

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

R582e Rocha, Vanessa de Moraes.
 Efeito do esteróide anabólico nandrolona sobre o nível de
 ansiedade em ratos. / Vanessa de Moraes Rocha. -- Piracicaba, SP
 : [s.n.], 2006.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ansiedade. 2. Diazepam. I. Marcondes, Fernanda Klein. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Anabolic steroids effects on anxiety level of rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Anxiety. 2. Diazepam

Área de Concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Maria José Costa Sampaio Moura, Luciano José Pereira, Fernanda Klein Marcondes

Data da Defesa: 24-10-2006

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 24 de Outubro de 2006, considerou a candidata VANESSA DE MORAES ROCHA aprovada.

Fernanda Klein Marcondes

PROFa. DRa. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Maria Jose Costa Sampaio Moura

PROFa. DRa. MARIA JOSE COSTA SAMPAIO MOURA

Luciano José Pereira

PROF. DR. LUCIANO JOSÉ PEREIRA

DEDICO

Aos meus pais

Vera e Edimar, meus verdadeiros mestres, sinônimos de amor, carinho, compreensão e formação sólida, que me proporcionaram todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão

Murilo, pelo companheirismo, por ser um irmão amável, prestativo e dedicado. Sempre preocupado e pronto a ajudar.

Ao meu noivo

Mateus, pela dedicação, apoio, afeto, reconhecimento e compreensão por tantos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições que não podem nem devem deixar de ser realçadas. Assim, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, que não me deixou fraquejar e desistir em uma fase tão importante da minha vida.

Aos meus pais, Vera e Edimar, pelo apoio, amor, incentivo e compreensão. Obrigada pelas preces me pedindo proteção, por sempre apoiarem meus sonhos e me ensinarem a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que trabalho e perseverança são fontes essenciais para atingir minhas metas.

Ao meu irmão, Murilo, pela dedicação, por ceder seu tempo e seus conhecimentos de informática para a finalização da minha dissertação. Devido a sua presença e preocupação com minhas dificuldades, alcancei mais esta conquista. E tenha certeza que tudo que fez por mim, farei por você sempre.

Ao meu noivo, Mateus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, dizendo que posso tudo o que quero e sou capaz de conseguir aquilo que desejo, que incentivou o meu trabalho desde do início e prestou valorosa ajuda com dicas, sugestões e apoio moral.

A minha orientadora e professora Fernanda Klein Marcondes, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A professora Maria Cecília, que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, o que com certeza contribuiu para ampliar a qualidade dos meus estudos.

Aos amigos e amigas, Luana, Karla, Gustavo, Mariana, Mariana Leite, Rafaela, Vander e Carol, por todo carinho e dedicação que tiveram por mim nesses anos. Especialmente a Rose, amiga fiel, companheira, que dedicou parte do seu doutorado para

auxiliar em minhas dificuldades, sendo essencial para a execução da minha dissertação, sou muito grata por tudo que me fez.

Aos funcionários da FOP/UNICAMP, especialmente ao Feliciano, pessoa dedicada ao trabalho, humana, justa, responsável e que me apoiou em minhas dificuldades laboratoriais, assim como na realização da minha pesquisa. Obrigada a Eliete e Patrícia pela forma profissional com que sempre me receberam.

A todos que contribuíram para a reflexão e realização deste trabalho, agradeço profundamente.

À FAPESP pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

(John Ruskin)

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1. ESTERÓIDES ANABOLIZANTES	05
2.2. ANSIEDADE E MODELOS EXPERIMENTAIS	13
2.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	21
3. PROPOSIÇÃO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. ANIMAIS	27
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.3. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	29
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	59

RESUMO

Os esteróides androgênicos anabólicos (EAA) são usados no tratamento de hipogonadismo masculino, andropausa associada ao envelhecimento, osteoporose, anemia associada à doença renal crônica, síndrome de imunodeficiência adquirida, politraumatismo e em períodos pós-operatórios. Porém, o uso de EAA, com finalidades não-terapêuticas, e em altas doses, apresenta graves efeitos colaterais que incluem alterações de humor, agressividade e aumento da incidência de suicídios. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do decanoato de nandrolona sobre o nível de ansiedade de ratos. Ratos machos Wistar, com 2 meses de idade foram aleatoriamente divididos em 6 grupos (n = 12-15/grupo): controle, veículo, nandrolona, controle + diazepam, veículo + diazepam e nandrolona + diazepam. Animais tratados com veículo ou nandrolona receberam administração de propilenoglicol (0,2 mL/ Kg i.m.) ou decanoato de nandrolona (5mg/Kg i.m.), respectivamente, 2 vezes por semana, durante 6 semanas. Ratos do grupo controle foram submetidos somente aos procedimentos relacionados à rotina do biotério. No fim de 6 semanas, todos os grupos foram submetidos ao teste do LCE, 24 h após a última administração de veículo ou nandrolona, ou período equivalente para o grupo controle. Para validação farmacológica dos resultados comportamentais, alguns animais foram tratados com diazepam (1mg/Kg i.p.), 30 min antes do teste comportamental. Os resultados foram comparados por análise de variância, e teste de Tukey ($p < 0,05$). Animais tratados com o nandrolona apresentaram menor porcentagem de tempo nos braços abertos ($1,46 \pm 0,90$) quando comparados àqueles tratados com veículo ($3,96 \pm 0,85$) e controles ($3,80 \pm 0,97$ %). O grupo tratado com nandrolona também apresentou menor porcentagem de entradas nos braços abertos ($6,00 \pm 1,67$) em relação aos grupos veículo ($15,06 \pm 2,80$) e controle ($16,75 \pm 3,30$ %). Contudo, a nandrolona não promoveu alteração no número de entradas nos braços fechados, na avaliação de risco e no número de idas ao final dos braços abertos. O tratamento com diazepam reverteu os efeitos causados pela nandrolona na porcentagem de tempo e no número de entradas nos braços abertos. Estes dados sugerem que o decanoato de nandrolona induziu aumento no nível de ansiedade em ratos de laboratório.

ABSTRACT

Androgenic anabolic steroids (AAS) are used for the treatment of male hypogonadism, andropause associated with elderly, osteoporosis, anemia associated with kidney failure, acquired immunodeficiency disease syndrome, politraumatism and post-surgery periods. However, the AAS abuse and non-therapeutic use, in higher doses show side effects, including mood alterations, aggressiveness and higher suicide incidence. The aim of this study was to evaluate the nandrolone decanoate effect on the anxiety levels in rats. Male Wistar rats (2 mo.) were randomly divided into 6 groups (n = 12-15/groups: control, vehicle, nandrolone, control + diazepam, vehicle + diazepam, and nandrolone + diazepam. The vehicle or nandrolone treated animals received injection of propilenglycol (0,2mL/Kg, i.m.) or nandrolone decanoate (0,5 mg/Kg i.m.), respectively, twice a week, for 6 weeks. Control group rats were subject only to procedures related to their routine living conditions. By the end of 6 weeks, all groups were submitted to the elevated plus maze (EPM), 24 hours after the last vehicle or nandrolone injection, or equivalent period for the control group. In order to pharmacological validation, some animals were treated with diazepam (1 mg/Kg i.p.) 30 min before the EPM. Data were analyzed by Two-way ANOVA and post-hoc Tukey test ($p < 0,05$). Nandrolone treated animals showed less percentage of time spent in the open arms ($1,46 \pm 0,49$) compared with control ($3,80 \pm 0,97$) and vehicle ($3,96 \pm 0,85$ %) groups. Nandrolone treated animals also showed less percentage of open arms entries ($6,00 \pm 1,67$) in relation to vehicles groups ($15,06 \pm 2,80$) and control groups ($16,75 \pm 3,30$ %). However, nandrolone did not promote any changes in enclosed arms entries, risk assessment and final open arms end- exploring. Diazepam treatment reverted the effects of nandrolone in the time and entries percentage in the open arms. The present data showed that the treatment with a high dose of nandrolone decanoate induced an increase in the anxiety level in rats.

1. INTRODUÇÃO

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são usados na medicina há pelo menos quatro décadas. A indicação terapêutica clássica dos EAA está associada a situações de hipogonadismo nos homens e a quadros de politraumatismos, queimaduras e períodos pós-operatórios, nos quais os pacientes podem apresentar deficiência no metabolismo protéico (Wilson, 1996; Creutzberg & Schols, 1999). No tratamento da anemia associada à doença renal crônica, há indicação de tratamento com EAA por estimular a síntese de eritropoetina e a eritropoese (Ballal *et al.*, 1991; Berns *et al.*, 1992). Além destas aplicações, a associação de EAA ao tratamento da osteoporose (Van Wayjen, 1972; Gordon *et al.*, 1999) e da síndrome de imunodeficiência adquirida também tem mostrado efeitos satisfatórios (Creutzberg & Schols, 1999; Rabkin *et al.*, 2000; Currier, 2000). Esses hormônios são utilizados devido a sua eficiência em aumentar a retenção de nitrogênio e inibir o catabolismo protéico (Wilson, 1993).

Porém, os EAA vêm despertando a atenção de pesquisadores e profissionais na área de Saúde devido a sua utilização, sem prescrição médica e em altas doses, por atletas com o objetivo de aumentar a massa muscular para fins estéticos ou melhora do desempenho físico (Crist *et al.*, 1983; Brower *et al.*, 1990; Titlestad *et al.*, 1994; Creutzberg & Schols, 1999). Esta utilização apresenta vários efeitos colaterais, tais como, atrofia do tecido testicular, tumores hepáticos e prostáticos (Johnson, 1985; Yesalis, 1993), alterações no metabolismo lipídico (Kuipers *et al.*, 1991), alterações emocionais (Gruber & Pope Jr, 2000) e o surgimento de sintomas psicóticos (Pope & Katz, 1988). Em animais de laboratório, o tratamento com altas doses de EAA induziu alterações comportamentais como o aumento na agressividade (Breuer *et al.*, 2001). Porém, ainda não está clara a relação entre ansiedade e o uso de esteróides anabólicos, já que tanto efeitos ansiogênicos (Minkin *et al.*, 1993) quanto ansiolíticos (Aikey *et al.* 2002) foram relatados.

A ansiedade é uma forma de inibição comportamental que ocorre em resposta a eventos ambientais que representem novidade e/ou sejam punitivos (Rang *et al.*, 1995). Contudo, devido à influência de fatores sociais, econômicos, culturais, torna-se extremamente difícil a sua quantificação. Por essa razão, experimentos em animais de

laboratório são muito úteis. Em pesquisas comportamentais, modelos animais têm auxiliado os pesquisadores na compreensão dos mecanismos subjacentes à depressão e ansiedade, e na avaliação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de novos fármacos (Green & Hodges, 1991). A ansiedade dos animais pode ser avaliada utilizando-se o teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Considerando a necessidade de estudos controlados sobre os efeitos de esteróides androgênicos, e o seu uso freqüente, em doses excessivas, para fins não terapêuticos, e os potenciais riscos à saúde desta prática, o objetivo foi estudar o efeito do esteróide anabólico nandrolona sobre o nível de ansiedade de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTERÓIDES ANABOLIZANTES

De acordo com a definição clássica, hormônios são substâncias químicas secretadas, em pequenas quantidades, na circulação sangüínea e que, transportadas até os tecidos-alvo, produzem uma resposta fisiológica. Os hormônios são classificados quimicamente, como aminas, proteínas ou esteróides (Wilson, 1996). Os hormônios esteróides incluem os hormônios adrenocorticais, os metabólitos ativos da vitamina D e aqueles produzidos pelas gônadas, sendo o colesterol o precursor comum desta classe (Moorandian *et al.*, 1987).

Os esteróides androgênicos referem-se aos hormônios sexuais masculinos. O termo *andrógeno* é de origem grega, onde *andro* significa homem e *gennan*, produzir. Assim, a definição de um andrógeno é qualquer substância que produz efeitos masculinizantes.

Existem quatro formas principais de andrógenos circulantes na espécie humana: a testosterona, dihidrotestosterona (DHT), androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu derivado sulfatado (DHEAS) (Handa & Price, 2000).

As ações dos esteróides sexuais masculinos podem ser divididas em duas categorias: efeitos androgênicos, relacionados especificamente com a função reprodutora e características sexuais secundárias, e efeitos anabólicos, relacionados à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não-reprodutores.

Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólicos androgênicos (EAA) constituem um grupo de substâncias que inclui a testosterona, seus metabólitos e derivados sintéticos (Thein *et al.*, 1995; Handelsman, 2001), os quais possuem atividade anabólica (promoção do crescimento) e androgênica (masculinização) (Evans, 2004). Tais substâncias variam na relação entre a atividade anabólica e androgênica. Como nenhum fármaco disponível atualmente é capaz de desencadear somente efeitos anabólicos (Clarkson & Thompson, 1997; Lise *et al.*, 1999), o mais adequado é chamar a todos de esteróides anabólico-androgênicos (EAA) (American College of Sports Medicine - ACSM, 1987).

Desta forma, os EAA sintéticos, assim como os esteróides anabolizantes endógenos promovem atividades anabólicas e androgênicas. Os efeitos androgênicos e anabólicos da testosterona estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Efeitos androgênicos e anabólicos da testosterona (Ghaphery,1995).

Efeitos androgênicos	Efeitos anabólicos
Crescimento do pênis	Aumento da massa muscular esquelética
Espessamento das cordas vocais	Aumento da concentração de hemoglobina
Aumento da libido	Aumento do hematócrito
Aumento da secreção nas glândulas sebáceas	Aumento da retenção de nitrogênio
Aumento de cabelos do corpo e face	Redução dos estoques de gordura corporal
Padrão masculino dos pêlos pubianos	Aumento da deposição de cálcio nos ossos

O mecanismo intracelular para essas ações envolve a interação com o mesmo tipo de receptor (Mooradian *et al.*, 1987). O mecanismo de ação dos EAA se inicia com a passagem através da membrana celular do tecido alvo, e se ligam aos receptores específicos, em seguida este complexo EAA-receptor se move para o núcleo celular, e o DNA ribossomal produz novas proteínas que medeiam a ação dos hormônios (Creutzberg e Schols, 1999).

Alguns autores têm sugerido que os androgênios também podem alterar a estabilidade da membrana celular ou ainda atuar em canais iônicos. Neste sentido, Britan *et al.* (1993), observaram que o anabolizante dianabol aumentou o influxo de cloreto através de canais iônicos acoplados a receptores gabaérgicos. Assim, Jorge-Rivera *et al.*(2000), sugeriram que os androgênios podem modular a neurotransmissão gabaérgica no sistema nervoso central (SNC).

Os efeitos dos esteróides androgênicos anabólicos dependem da afinidade pelos receptores e da concentração deste receptor nos diferentes tecidos alvos. Porém diferenças na estrutura química e nos processos de metabolização dos EAA também influenciam seus efeitos (Wu *et al.*, 1997, Wilson, JD 1988; Lise *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2004; Lise *et al.*,

1999). Alguns efeitos da testosterona se devem a sua ação direta sobre receptores androgênicos. Porém metabólitos da testosterona formados a partir da ação 5 α -redutase também atuam nos receptores androgênicos com afinidade maior do que a própria testosterona. O metabólito dihidrotestosterona, por exemplo, apresenta afinidade pelo receptor androgênico 6 a 10 vezes maior em relação à testosterona (Wu *et al.*, 1997).

O decanoato de nandrolona ou Deca-Durabolin[®] foi desenvolvido pelo laboratório Organon e introduzido em 1962 como uma preparação anabólica injetável com ação prolongada de até três semanas, após administração intramuscular em humanos, sendo mundialmente um dos esteróides anabólicos mais utilizados (Kutscher *et al.*, 2002). Após a administração, o decanoato de nandrolona é gradualmente liberado e hidrolizado em nandrolona, a qual apresenta uma maior ação anabólica e menor atividade androgênica, comparada à testosterona (Wilson, 1996).

A nandrolona sofre ação da 5 α -redutase no meio intracelular. Entretanto, o metabólito resultante, 5 α -dihidrotestosterona, ao contrário da DHT, tem baixa afinidade pelo receptor androgênico. Esta conversão ocorre em grandes proporções nos órgãos sexuais, devido às altas concentrações da enzima 5 α -redutase, e em menor escala nos músculos esquelético e cardíaco. Assim, os efeitos androgênicos da nandrolona são menores do que os da testosterona. Como a presença de 5 α -redutase é menor, nos músculos, a própria nandrolona interage com os receptores para esteróides, produzindo respostas anabólicas relativamente maiores (Celotti & Cesi, 1992; Cunha *et al.*, 2004).

A nandrolona é classificada como um andrógeno não aromatizável (Hobbs *et al.*, 1996), devido a sua baixa taxa de conversão a estrógeno, e por isso seus efeitos feminilizantes indesejáveis, decorrentes da utilização do EAA em doses suprafisiológicas ou por longos períodos, são minimizados (Kuhn, 2002; Cunha *et al.*, 2004).

Quanto à utilização terapêutica dos EAA, há relatos de que, na antigüidade, os órgãos sexuais e suas secreções eram utilizados para o tratamento da impotência e como afrodisíaco. No final do século XIX, o fisiologista francês Charles Eduard Brown-Séquard experimentou uma terapia de rejuvenescimento, administrando, em si mesmo, injeções de um extrato líquido derivado de testículos de cães e porcos da índia, e relatou aumento da sua energia intelectual e da sua força física. (Hoberman, 1995).

Durante a Segunda Guerra Mundial, os EAA foram utilizados para restaurar o balanço positivo de nitrogênio em vítimas desnutridas, submetidas a jejum forçado (Ryan, 1981) e também com o objetivo de aumentar a agressividade dos seus soldados (Lise *et al.*, 1999). Ao término da 2ª Guerra Mundial, os androgênios eram utilizados no tratamento de pacientes em condições terminais ligados à debilidade crônica, bem como no traumatismo, em queimaduras, na depressão e na recuperação de grandes cirurgias. No entanto, somente na década de 50, os EAA tiveram maior aceitação para o uso médico (Coward, 1989).

A indicação terapêutica clássica dos EAA está associada a deficiências androgênicas: hipogonadismo, puberdade e crescimento retardados, micropênis neonatal, deficiência androgênica secundária a doenças crônicas (Conway *et al.*, 2000). Recentemente, EAA têm sido utilizados no tratamento da andropausa, estado de baixa testosterona ou hipogonadismo, que está associada ao processo de envelhecimento. Como consequência desta deficiência hormonal, os pacientes apresentam sintomas que podem incluir perda de energia e de concentração, memória, insônia, obesidade abdominal, diminuição de atividade sexual. Os efeitos a longo prazo do hipogonadismo incluem diminuição da massa muscular, densidade óssea e possíveis efeitos sobre o sistema cardiovascular e no cérebro. Em relação aos sintomas psicológicos, a andropausa promove diminuição da sensação de bem estar, ansiedade, irritabilidade, nervosismo, variação de humor e estado de depressão (Sternbach, 1998; Tan & Philip, 1999). A andropausa prematura pode resultar do uso excessivo de esteróides anabólicos, levando à inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e diminuição da secreção de gonadotrofinas (Tan & Vasudevan, 2003).

Os EAA são também indicados em situações de politraumatismos, queimaduras e períodos pós-operatórios, nos quais os pacientes podem apresentar deficiência no metabolismo protéico (Wilson, 1996; Creutzberg & Schols, 1999), no tratamento da anemia associada à doença renal crônica, uma vez que estes estimulam a síntese de eritropoetina e a eritropoese (Ballal *et al.*, 1991; Berns *et al.*, 1992). Além destas aplicações, a associação de EAA ao tratamento da osteoporose (Van Wayjen, 1972; Gordon *et al.*, 1999) e da síndrome de imunodeficiência adquirida também tem mostrado efeitos satisfatórios (Creutzberg & Schols, 1999; Rabkin *et al.*, 2000; Currier, 2000).

Porém a utilização destas substâncias sem prescrição médica, e em altas doses, dentro e fora do meio desportivo (Silva *et al.*, 2002), vem despertando o interesse de pesquisadores e de profissionais da área da Saúde. Através de levantamentos epidemiológicos referentes ao uso indiscriminado de EAA, é possível verificar dados concretos e assustadores acerca do tema, principalmente no que diz respeito ao aumento da taxa de mortalidade entre os usuários de tais substâncias.

Um estudo realizado em adolescentes mostrou que 27% dos consumidores de EAA os utilizavam única e exclusivamente para a melhoria da aparência (Wu, 1997; Mottram & George, 2000). Estima-se que centenas de adolescentes norte-americanos têm se utilizado de EAA (Pope *et al.* 1988; Buckley *et al.*, 1988; Durant *et al.*, 1993). Yesalis (1992) estima que entre 4 e 11% dos homens e entre 0,5 e 2,5 % das mulheres já consumiram EAA em alguma ocasião, e entre os levantadores de peso, essa proporção seria de 33% a 62% (Brower, 1993).

No Brasil, foi pesquisada a incidência do uso desses medicamentos de forma ilícita, de acordo com a idade, escolaridade e gênero. Observou-se que os medicamentos mais utilizados por estudantes são os ansiolíticos, anfetaminas, anabolizantes e barbitúricos e que existe uma maior prevalência na utilização de ansiolíticos e anfetaminas entre as meninas, enquanto que a utilização de anabolizantes é predominante em meninos (Magalhães *et al.*, 1991; Boskovitz *et al.* 1995; Pizzol *et al.*, 2006). O uso de anfetaminas, barbitúricos e anabolizantes foi maior em alunos acima de 12 anos (Galduroz *et al.*, 1997; Pizzol *et al.*, 2006). As anfetaminas e ansiolíticos foram mais consumidos nas escolas particulares, quando comparados às públicas, e seu consumo é maior em estudantes do ensino médio e em alunos com defasagem escolar. Interessantemente, o uso de barbitúricos e anabolizantes está associado à defasagem escolar. Também foi verificado neste estudo que esses indivíduos tinham fácil acesso aos medicamentos em farmácias, academias, e que geralmente o seu uso era indicado por parentes ou amigos. O uso de ansiolíticos também é bastante associado com outros medicamentos sendo de maior incidência com anfetaminas, anabolizantes e barbitúricos, nessa ordem (Pizzol *et al.*, 2006). Os resultados são semelhantes entre universitários (Barcellos *et al.* 1997).

Dentre os efeitos colaterais do uso de altas doses de EAA, podem ser citados a atrofia do tecido testicular, infertilidade, impotência, dificuldade ou dor para urinar e hipertrofia prostática, tumores hepáticos e de próstata (Johnson, 1985; Yesalis, 1993), e ginecomastia, devido à maior quantidade de hormônio androgênico convertido a estrógeno, pela ação da aromatase. Na mulher, pode ocorrer a masculinização, evidenciada pelo engrossamento de voz e crescimento de pêlos no corpo no padrão de distribuição masculino; irregularidade menstrual e aumento do clitóris (Wu, 1997). Com a administração contínua e prolongada, muitos desses efeitos são irreversíveis (De Rose *et al.*, 1999).

Dentre as alterações comuns em ambos os sexos, estão o aparecimento de acnes, calvície, aumento da libido; ruptura de tendão, devido ao aumento exagerado de massa muscular sem equivalente desenvolvimento do tecido tendinoso, aumento dos níveis de colesterol de baixa densidade (LDL), e diminuição do colesterol de alta densidade (HDL) (Kuipers *et al.*, 1991), infarto agudo do miocárdio, morte súbita por hipertrofia ventricular esquerda (Fineschi *et al.*, 2001). Quando utilizados na puberdade, causam o fechamento das epífises ósseas, acarretando déficit final do crescimento em consequência do amadurecimento ósseo precoce (De Rose *et al.*, 1999).

A utilização dessas substâncias também está associada a um tipo de tumor de fígado, conhecido como peliose hepática, cuja evolução resulta em hemorragia neste órgão que pode ser fatal (Stimac *et al.*, 2002). Com base nos níveis elevados das transaminases séricas aspartato aminotransferase (AST/TGO) e alanina aminotransferase (ALT/TGP), vários estudos demonstraram disfunção hepática secundária à administração de doses excessivas de EAA (Pertusi *et al.*, 2001). Estas enzimas estão presentes em vários tecidos do organismo, entretanto elevam-se mais freqüentemente em pacientes com alterações hepáticas, podendo refletir dano ao fígado, razão pela qual, vários autores as denominam enzimas hepáticas (Mincis, 2001). Ainda que a administração intramuscular de EAA tenha se mostrado menos lesiva para o tecido hepático do que a oral, Saborido *et al.* (1993) relataram que a aplicação intramuscular de doses excessivas (2mg/Kg, 5 dias/ semana de EAA em ratos, durante oito semanas), associado ou não à prática de exercício físico, modifica a capacidade hepática de metabolização de outros fármacos, sem afetar indicadores clássicos de disfunção hepática, como AST/TGO e ALT/TGO.

O uso abusivo de EAA também pode promover alterações hematológicas, entre essas alterações, foram observadas mudanças no tempo de coagulação. Os EAA estimulam a eritropoiese através do aumento da síntese de eritropoetina, podendo causar policitemia e aumento do hematócrito, o que pode favorecer a formação de trombos e aumentar os riscos de ocorrência de acidente vascular cerebral isquêmico. Além disso, podem aumentar a agregação plaquetária e diminuir a fibrinólise e também alterar a imunidade humoral, através da diminuição dos níveis das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA (Dawson, 2001).

Outros riscos à saúde estão relacionados à forma de consumo dos EAA. Nos Estados Unidos, 50% dos usuários utilizam EAA por via intramuscular, sendo que 20% destes compartilham seringas, havendo grande risco de contraírem alguma doença infecto-contagiosa. Rich *et al.* (1999) relataram em seu estudo a incidência de infecções decorrentes da administração de EAA por via intramuscular em atletas de fisiculturismo e levantamento de peso. Foram encontrados três casos de infecção por HIV (heterossexuais que compartilharam seringas em várias ocasiões), um por hepatite B (conjuntamente com um dos casos de HIV), um por hepatite C, oito relatos de formação de abscessos, sendo que dois casos ocorreram depois do uso de um preparo de estanozolol veterinário contaminado, e os demais casos, devido à falta de assepsia e pela procedência incerta das drogas, e outro de infecção por *Candida albicans*, imunossupressão secundária pelo uso de anabolizantes por dois anos (Rich *et al.* 1999).

Os efeitos dos EAAs sobre o comportamento dos usuários também têm sido amplamente pesquisados. Middleman *et al.*, (1995), apontam os EAAs como fatores que favorecem a ocorrência de comportamentos de risco, que incluem o uso de seringas compartilhadas. O uso de EAA também está ligado à agressividade (Yesalis *et al.*, 1993), irritabilidade, raiva e hostilidade (Cowart, 1989) e sintomas cognitivos como distração, esquecimento e confusão, alterações de humor (Gruber & Pope Jr, 2000; Bahrke *et al.*, 2000).

Corrigan (1996) divide os efeitos psicológicos provocados pelo uso contínuo de EAA, em altas doses, em três estágios. O primeiro estágio se caracteriza por efeitos a curto prazo, que incluem mudanças de humor e euforia, melhora da auto confiança, auto-estima, entusiasmo, motivação, redução da fadiga e diminuição da libido. O segundo estágio, inclui

efeitos a longo prazo, como perda de inibição, variações de humor, impulsividade e agressividade. No terceiro estágio, com a continuidade do consumo de altas doses por longos períodos, os sintomas podem se intensificar e o usuário se torna mais violento, hostil, desenvolvendo comportamento anti-social, auto-destrutivo, como por exemplo dirigir de forma irresponsável envolvendo-se em acidentes automobilísticos.

No que diz respeito aos efeitos imediatos são ressaltadas a mudança de humor e a euforia, onde existe melhora da confiança, energia e auto-estima, aumento da motivação e do entusiasmo. O usuário também apresenta diminuição da fadiga, insônia e habilidade para treinar com dor, irritação, raiva e agitação. Os efeitos graves manifestam-se quando esses sentimentos de agressividade evoluem para comportamentos violentos, hostis e anti-sociais. (Pagonis *et al.* 2005). Os ataques de fúria vão desde o abuso infantil a assassinatos. Além disso, a ocorrência de sintomas psicóticos (Pope & Katz, 1988) e casos de suicídios (Thiblin *et al.*, 1999) também foram relacionados ao uso de altas doses de EAA.

Além disso, os EAA também podem causar dependência em usuários atletas competitivos e recreacionais, provocando assim, a síndrome de abstinência ligada às síndromes comportamentais (Copeland *et al.*, 2000; Parssinen & Seppala, 2002).

Os efeitos dos EAA sobre a ansiedade ainda não estão bem esclarecidos, já que tanto respostas ansiogênicas quanto ansiolíticas foram relatadas (Minkin *et al.* 1993, Rojazz-Ortiz *et al.*, 2006), em animais de laboratório.

Estudos clínicos e experimentais ainda são necessários para melhor compreensão dos efeitos comportamentais decorrentes do uso de altas doses de EAA.

2.2. ANSIEDADE E MODELOS EXPERIMENTAIS

A ansiedade é um estado emocional que apresenta sintomas como alteração do humor, geralmente acompanhados por alterações comportamentais e fisiológicas, tais como palpitações, hipervigilância e sudorese (Pratt, 1992). A ansiedade é uma resposta de alerta eficaz contra uma ameaça ou um estímulo estressante (Pratt, 1992), e pode contribuir para o desempenho em tarefas cognitivas (Graeff *et al*, 1997). Contudo, o limite entre a ansiedade normal e a patológica é muitas vezes difícil de ser estabelecido.

A ansiedade patológica é observada quando a resposta a um determinado estímulo é percebida muito intensamente, de maneira desproporcional ao estímulo, interferindo na qualidade de vida do indivíduo e na capacidade em desempenhar normalmente suas funções (Pratt, 1992; Graeff *et al.*, 1993).

Tanto em indivíduos normais como em pacientes com ansiedade patológica, a ansiedade pode ser distinguida entre ansiedade traço e ansiedade estado. A ansiedade estado é definida como um estado emocional transitório ou condição do organismo humano caracterizada por sentimentos desagradáveis de tensão e apreensão, conscientemente percebidos, com aumento da atividade do sistema nervoso autônomo. A ansiedade traço refere-se a diferenças individuais na pré-disposição à ansiedade, isto é, a diferenças na maneira de reagir a situações percebidas como ameaçadoras com maior ou menor intensificação do estado de ansiedade (Andrade & Gorenstin, 1998).

Discute-se também a distinção entre ansiedade e medo. Ambos são semelhantes, porém, enquanto o medo é fruto de ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (Graeff & Brandão, 1999; Graeff & Guimarães, 2001). O medo e a ansiedade são estados emocionais com alto valor adaptativo, associados a reações defensivas desenvolvidas em situações de ameaça à integridade física ou a sobrevivência do organismo encontrados no meio ambiente onde evoluíram. (Graeff *et al.*, 1997). As fontes de perigo são diversas, como predadores, estímulos ou situações ambientais que são altura, iluminação, dor, novos lugares e objetos, confrontação e competição com animais da mesma espécie.

Para interagir com essas mudanças, os animais geralmente usam uma das quatro estratégias básicas: esquiva, imobilização, ataque defensivo e submissão (Graeff & Zangrossi, 2002). A escolha de uma estratégia de defesa leva em consideração vários fatores, tais como as características do ambiente, à distância do estímulo ameaçador e experiências prévias. Assim, em situações de ameaça como a aproximação de um predador, os animais irão preferencialmente escapar. Por outro lado, em uma situação de proximidade e contato com um predador, lutas vigorosas, ameaças defensivas ou o ataque ao predador podem ser mais eficientes. Alternativamente certas espécies incluindo pássaros, peixes e alguns mamíferos podem desempenhar um estado de imobilidade tônica, “fingindo-se” de morto por meio do qual os animais podem diminuir o interesse do predador (Marks & Nesse, 1994). No entanto, as respostas de submissão quase nunca inibem o ataque predatório (Graeff *et al.*, 1997).

Diferentes neurotransmissores estão envolvidos no estabelecimento da ansiedade. Entre eles estão alguns peptídeos como o fator liberador de corticotrofina, hormônio adrenocorticotrófico, colicistocinina, esteróides e, principalmente, a corticosterona; aminas biogênicas representadas pelas noradrenalina, serotonina e dopamina; e aminoácidos como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina. No entanto, o GABA e a serotonina (5-HT) são os mais relacionados aos distúrbios da ansiedade (Graeff *et al.*, 1997).

A participação do GABA na ansiedade foi sugerida por estudos sobre o mecanismo de ação dos benzodiazepínicos, ansiolíticos introduzidos na prática médica no início da segunda metade do século XX, após observações de que o clordiazepóxido, um composto benzodiazepínico, tornava os macacos *Cinomolgus* mais mansos (Randal *et al.*, 1960). Imamura & Prasad (1998) mostraram que seu mecanismo de ação estava relacionado a uma redução significativa do influxo de Cl^- estimulado pelo GABA, no hipotálamo de ratos altamente ansiosos. Baseado em efeitos observados em modelos animais de ansiedade, foi sugerido que esse composto poderia ter potencial terapêutico no homem (Graeff & Brandão, 1999).

O sistema GABAérgico é responsável pela inibição química no SNC. Os receptores gabaérgicos são acoplados a canais iônicos altamente permeáveis ao íon cloreto

(Cl⁻). Quando estes receptores são ativados, os canais iônicos se abrem permitindo o influxo de Cl⁻ através da membrana neuronal a favor do gradiente eletroquímico. O influxo de cargas negativas para o interior da célula produz hiperpolarização da membrana neuronal e inibe a despolarização da mesma (Korpi & Sinkkonen, 2006), causando os efeitos sedativos e hipnóticos dos agonistas e moduladores de receptores GABA_A, tais como os benzodiazepínicos, neuroesteróides, barbitúricos, álcool e anestésicos (Mehta *et al.*, 1999).

Na clínica terapêutica, os benzodiazepínicos são eficazes no tratamento do distúrbio da ansiedade generalizada, possuem baixíssima toxicidade e menor capacidade de produzir tolerância e dependência comparados aos barbitúricos, durante um tratamento crônico (Graeff *et al.*, 1997). Porém, podem afetar funções cognitivas, por induzir sedação, diminuir a atenção e produzir amnésia anterógrada (Bateson 2002; Buffett-Jerrot & Stewart, 2002; Mancuso *et al.*, 2004). Além do clordiazepóxido, outro composto pertencente à família dos benzodiazepínicos, muito utilizado na prática clínica e experimental, é o diazepam (Graeff *et al.*, 1997).

Apesar de os primeiros benzodiazepínicos utilizados serem produtos sintéticos, há evidências de que existem compostos endógenos com função neuromoduladora no SNC de mamíferos, que atuam sobre receptores gabaérgicos regulando os estados normais ou patológicos de ansiedade. A presença destes receptores no SNC corrobora esta hipótese (Medina *et al.*, 1993; Graeff *et al.*, 1997).

Os distúrbios da função dos receptores GABA_A estão envolvidos na patofisiologia de desordens como o alcoolismo, ansiedade, autismo, depressão, síndrome pré-menstrual, esquizofrenia e desordens do sono. Estes distúrbios, por sua vez, podem estar ligados a fatores genéticos, como por exemplo, mutações nas subunidades de receptores gabaérgicos ou polimorfismos gênicos, alterando a função do receptor GABA_A, devido a mudanças na composição ou expressão de suas subunidades (Smith *et al.*, 1998, Benes, 1999, Delorey & Olsen, 1999, Lancel, 1999; Brambilla *et al.*, 2003).

Além do sistema GABAérgico, a transmissão serotoninérgica também participa na modulação da ansiedade. As primeiras evidências neste sentido estão

relacionadas a demonstrações de que agonistas de receptores de serotonina promoviam efeitos ansiolíticos comparáveis aos dos benzodiazepínicos (Graeff & Schoenfeld, 1970). Esta hipótese é decorrente de observações de que os ansiolíticos benzodiazepínicos diminuem a atividade dos neurônios serotoninérgicos, corroborando com a proposição da teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, a qual atribui um papel ansiogênico para a serotonina (5-HT) (Stein *et al.*, 1973).

O antagonista serotoninérgico ritanserina tem demonstrado eficiência no tratamento clínico da desordem de ansiedade generalizada. Em teste de ansiedade com humanos, este antagonista serotoninérgico acelerou a extinção de resposta de condutância na pele em resposta a estímulos aversivo, causado pela apresentação num auditório (Hensman *et al.*, 1991) e causou aumento na ansiedade causada pela apresentação em frente de uma câmera de vídeo (Deakin *et al.*, 1992).

Deakin & Graeff, (1991) propuseram que distintas vias serotoninérgicas e subtipo de receptores da 5-HT modulariam diferentes classes de ansiedade. As vias ascendentes serotoninérgicas, as quais chegam ao núcleo dorsal da Rafe (DRN) e inervam a amígdala e o córtex frontal, facilitariam os comportamentos defensivos que ocorrem em resposta a uma ameaça potencial. Devido a estas estratégias de comportamento envolverem geralmente aprendizado e memória, elas representam o medo condicionado que pode ser relacionado com a ansiedade clínica antecipatória e desordem da ansiedade generalizada. Por sua vez, as vias paraventricular-DRN, que inervam o hipotálamo medial e a matéria cinza periaquedutal dorsal (DPAG), inibiriam as reações de luta e fuga inatas em resposta a um perigo próximo. Estes autores sugerem que a liberação de 5-HT na amígdala promove aumento do medo condicionado (evitação inibitória), enquanto a liberação desta amina na DPAG diminuiu o medo incondicional (a esquiva).

Os efeitos da 5-HT são mediados por sete classes de receptores: o receptor 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇. A buspirona é um dos primeiros ansiolíticos de ação serotoninérgica. Sua ação é muito mais lenta que a ação dos benzodiazepínicos e seus efeitos ansiolíticos podem não ser aparentes até várias semanas após o início de tratamento (Lister *et al.*, 1990). A buspirona atua preferencialmente em auto-receptores 5-HT_{1A} no núcleo da Rafe (Hoyer & Martin, 1997). A ativação desses

auto-receptores pré-sinápticos promovem uma redução na quantidade de 5-HT em nível pós-sináptico, provavelmente na amígdala e no hipocampo. Desta forma, a ação ansiogênica da 5-HT parece ser minimizada sob efeito desta droga.

Os antidepressivos tricíclicos e inibidores da MAO, em particular a imipramina, também são efetivos no tratamento da desordem do pânico e na ansiedade generalizada (Kahn *et al.*, 1988), e atuam por meio da inibição dos sistemas de metabolização da 5-HT.

Muitas das informações sobre os mecanismos neuronais subjacentes à ansiedade foram obtidos por meio da experimentação animal. Modelos comportamentais em animais mimetizam algumas características elementares de um estado patológico específico, favorecendo a sua compreensão e o desenvolvimento de terapias eficazes. Também fornecem uma aproximação simplificada aos complexos fatores relacionados à patologia e simplificam o sistema estudado, reduzindo o número de variáveis cujo controle é inacessível, oferecendo, assim, maior grau de controle experimental e permitindo manipulações experimentais que poderiam ser impossíveis em outras circunstâncias (Thrane *et al.*, 1995).

Os modelos animais para estudos comportamentais baseiam-se em respostas incondicionadas, ou seja determinadas pelo comportamento inato do animal, e em repostas condicionadas, determinadas pela aprendizagem associativa. Os modelos com base em respostas incondicionadas são fáceis, rápidos, utilizam equipamento de baixo custo, não exigem restrição de água ou comida e utilizam estímulos naturais. Porém nesses modelos, alguns índices comportamentais podem ser confundidos com alterações na atividade motora, e animais submetidos a estes modelos não podem ser reutilizados e ocorre grande variabilidade nas medidas basais, devido à habituação do comportamento. Além disso, os modelos baseados em respostas não condicionadas não são eficazes para a observação de efeitos crônicos de drogas (Dawson & Triecklebank, 1995).

Os modelos baseados em respostas condicionadas têm como vantagem, a consistência e reprodutibilidade das medidas basais observadas no comportamento e a possibilidade de reutilização dos animais. Por outro lado estes modelos exigem treino intensivo do experimentador, restrição alimentar e hídrica do animal. Seus resultados são

afetados por sedação, relaxamento muscular e somente os benzodiazepínicos apresentam efeitos consistentes (Dawson & Triecklebank, 1995).

Os modelos baseados na aprendizagem associativa compreendem a resposta emocional condicionada, caracterizada pela supressão de uma resposta operante positiva e reforçada, por exemplo, diante da apresentação de um estímulo tornado aversivo pela associação com choque (Mèthot & Deutsch, 1984). Dentro desta categoria está o modelo de sobressalto intensificado pelo medo (Davis, 1988). Esse paradigma é usado para estudar as bases neurobiológicas do medo e da ansiedade, foi desenvolvido por Brown & Faber (1951) e é baseado no princípio de condicionamento clássico de Pavlov. Seu desempenho envolve dois passos distintos: inicialmente os animais são treinados a associar um estímulo neutro de condicionamento a um estímulo aversivo, por exemplo, associar uma luz à um choque elétrico nas patas. Depois do treino os animais são submetidos a um som intenso e a amplitude de seu reflexo de sobressalto a esse estímulo incondicional é medido na presença ou ausência do estímulo condicionado à luz. Foi demonstrado que a amplitude do reflexo de sobressalto relacionado ao som é maior quando ocorre na presença do estímulo condicionado, ou seja, a luz.

Entre os modelos baseados nos comportamentos inatos está o modelo de transição claro–escuro, cujo índice de ansiedade se baseia no número de transição entre dois ambientes, sendo um ambiente claro e amplo e o outro, escuro e pequeno (Crawley, 1981). Outros testes enfocam o comportamento de interação social através da frequência de interações entre dois animais colocados juntos, sendo que, esta frequência é inversamente correlacionada com a ansiedade (File & Hyde, 1978). O teste de vocalização induzida pela separação maternal está inserido no paradigma de interação social e é considerado um modelo de ansiedade no qual sons são emitidos pelos filhotes após a separação de sua mãe. Estas vocalizações diminuem em número, potência e frequência seguido de administração de diazepam (Insel *et al.*, 1986), demonstrando sua validade para avaliação do potencial de drogas ansiolíticas e ansiogênicas.

O teste enterro defensivo foi originalmente desenvolvido por Pinel & Treit (1978) e explora o comportamento típico de roedores de enterrar objetos que estão associados a um estímulo aversivo. Neste modelo, os ratos que levam um choque por uma

sonda montada na caixa de teste uma única vez, retornam para enterrar a sonda com o material presente na gaiola. Este comportamento foi observado quando os choques foram distribuídos vinte dias antes do teste, confirmando a função da aprendizagem aversiva neste paradigma (Pinel & Treit, 1978).

O teste de campo aberto é um teste comportamental empregado na avaliação do comportamento exploratório de ratos. O modelo de campo aberto é um teste muito útil na pesquisa de comportamento animal, pois requer um aparato mínimo para sua realização. Atualmente existem campos abertos circulares (ou arena circular), quadrados, que são os mais tradicionais, ou com orifícios no solo (*holeboard*), (Simon *et al.*, 1994; Rex *et al.*, 1996; Rebouças & Schimidek, 1997; Schmitt & Hiemke, 1998). Esse paradigma foi validado por File & Wardill, (1975) como teste de ansiedade e medida de atividade locomotora, pelo erguer-se, limpar-se e por respostas autonômicas, como defecação e micção.

Outro modelo comportamental é o Labirinto em T elevado, designado para avaliar o envolvimento da serotonina nas desordens de ansiedade generalizada (DAG) e desordem do pânico (DP). Deakin e Graeff (1991) sugeriram que o medo condicionado está relacionado com a ansiedade generalizada, enquanto o medo incondicionado está associado à desordem do pânico. Neste modelo, o medo condicionado é facilitado, enquanto que o medo incondicionado é inibido pela serotonina liberada de fibras nervosas originadas no núcleo dorsal da rafe. O labirinto em T elevado foi elaborado para separar a ansiedade generalizada do medo incondicionado (Viana *et al.*, 1994). Esse aparato é composto de dois braços abertos e um fechado, perpendicular aos abertos, sendo o fechado com paredes de 40 cm de altura a 50 cm do chão. Nesse teste os animais desenvolvem duas tarefas, a evitação inibitória e a esquivar por uma via, que representam a ansiedade generalizada e o medo condicionado, respectivamente.

No labirinto em T elevado, se os ratos são colocados no fim do braço fechado, eles não vêem os braços abertos até que projetem a cabeça em direção aos braços abertos. Como a exploração dos braços abertos é uma experiência aversiva, porque os roedores apresentam medo inato de espaços abertos, a colocação repetida dos animais no braço fechado permite que eles aprendam a evitação inibitória dos braços abertos neste aparato.

Esta evitação está relacionada ao medo condicionado e à ansiedade generalizada. Por outro lado, se os ratos são colocados no final de um braço aberto, ele pode ir para o único braço fechado do aparato, desempenhando, então, uma resposta de fuga, que representa o medo incondicional e que está relacionado à desordem do pânico (Viana *et al.*, 1994).

O labirinto em Y é um teste designado para avaliar a memória espacial. Ele é baseado na tendência inata dos roedores em explorar novos ambientes (Dellu *et al.*, 2000). O labirinto em Y consiste de três braços idênticos de 50 cm de comprimento, 16 cm de largura e 32 cm de altura, simetricamente estendido a partir de um centro. Um destes braços foi designado como a origem e outro braço como “novidade”, e vários objetos são colocados no ambiente ao redor do labirinto para oferecer sugestões a respeito da localização. O labirinto em Y consiste de duas triagens separados por um intervalo para acesso da memória espacial. A primeira triagem tem duração de 10 min e permite que o animal explore os dois braços do labirinto, sendo que o terceiro braço permanece bloqueado. Depois do intervalo, é feita a segunda triagem, durante a qual os três braços estão acessíveis e consiste numa novidade. Todos os dados são analisados comparando o comportamento em todos os braços. Para a segunda triagem, os ratos são colocados de costa para o labirinto, começando no mesmo braço, com livre acesso para todos os três braços por cinco minutos. Todas triagens são gravadas para análise. Os dados são expressos em porcentagem do tempo total e a distância percorrida durante os cinco minutos (Akwa *et al.*, 2001). Usando o labirinto em Y, Montgomery (1955) mostrou que os animais preferiam nitidamente os braços fechados. A exposição a um estímulo novo causa aumento da exploração e do medo, gerando conflito aproximação e evitação.

Com a utilização de modelos animais para o estudo da ansiedade é possível reproduzir os aspectos da sintomatologia, etiologia, e possíveis tratamentos para a ansiedade, bem como identificar compostos ansiolíticos e ansiogênicos, e seus mecanismos de ação (Treit, 1985; File *et al.*, 1992). A validação de um modelo de ansiedade inclui a demonstração de sua sensibilidade a drogas ansiolíticas de uso terapêutico (File & Pellow, 1985; File *et al.*, 1987), e a presença de correlação, homologia e isomorfismo em relação ao que se obtém na clínica (Treit, 1985). Os modelos acima citados e também o teste do

labirinto em cruz elevado, que foi utilizado no presente estudo e será abordado no próximo item, atendem a estes critérios.

2.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Este modelo comportamental foi desenvolvido por Handley e Mithani em 1984, a partir do labirinto em Y utilizado por Montgomery (1955). O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparato no qual ratos podem explorar livremente dois braços abertos e dois braços fechados (BF) por paredes laterais. Este aparato foi validado para estudos comportamentais utilizando ratos (Pellow *et al.*, 1985) e camundongos (Lister, 1987). Este modelo comportamental não exige manipulação prévia, nem treinamento dos animais e é sensível a agentes ansiolíticos e ansiogênicos. A validação comportamental, fisiológica e farmacológica deste paradigma foi realizada por Pellow *et al.* (1985), mostrando que este teste é uma ferramenta útil para avaliar ansiedade no rato.

O comportamento exploratório normal de ratos favorece a exploração de braços fechados. Treit *et al.* (1993) demonstraram que embora os animais sejam capazes de discriminar a altura dos braços abertos (BA). A aversão pelos braços abertos parece ser motivada pela tigmotaxia, uma resposta de defesa natural do animal que induz a permanência próxima a superfícies verticais, provavelmente para dificultar a captura por predadores (Treit e Fundytus, 1988). O animal percebe o ambiente ao seu redor, através do contato das vibrissas com as paredes verticais, permitindo uma melhor percepção do ambiente e, conseqüentemente, faz com que o animal se sinta mais seguro. Ao contrário, ambientes abertos geram medo e ansiedade, assim, os roedores apresentam uma tendência a permanecer próximos a paredes verticais, o que é conhecido como tigmotaxia, e explica a preferência dos animais pelos braços fechados no LCE (Treit *et al.*, 1993).

A tendência em permanecer nos braços fechados do labirinto é aumentada por estímulos ansiogênicos, que aumentam a aversão pelos braços abertos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987). Ao contrário, estímulos ansiolíticos reduzem a aversão natural aos braços abertos e favorece a exploração dos mesmos (Pellow *et al.*, 1985; Dawson *et al.*, 1995).

O teste do LCE consiste em colocar o animal no centro do aparato e deixá-lo livre para explorar o mesmo durante 5 minutos. A proporção de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, expressos em porcentagem do tempo total e do número total de entradas, em braços abertos e fechados, são considerados índice de ansiedade, já que aumento no nível de ansiedade diminui a exploração dos braços abertos (Pellow, *et al.*, 1985; Lister, 1987; File, 1991, 1992). Já o número de entradas nos braços fechados é diretamente proporcional à atividade locomotora (File, 1991, 1992; Cruz *et al.*, 1994). A exploração das extremidades dos braços abertos também é inversamente proporcional ao medo experimentado pelo animal no labirinto em cruz elevado (Cruz *et al.*, 1994).

Vários estudos foram elaborados para melhor compreensão dos aspectos metodológicos envolvidos no LCE, enfatizando fatores como material utilizado na construção do aparato, o horário de execução do experimento, a luminosidade e a duração do procedimento. Outros fatores relacionados à espécie e às diferenças sexuais têm sido considerados.

O material utilizado na confecção do aparato e a presença de bordas rasas nos braços abertos do LCE podem influenciar no comportamento do animal (Hogg, 1996). Fernandes & File (1996) realizaram um experimento no qual ratos foram colocados no LCE com e sem bordas no braço aberto, após a administração de clordiazepóxido. A presença de bordas alterou a sensibilidade ansiolítica na primeira e na segunda sessão do teste, visto que, o clordiazepóxido produziu um efeito ansiolítico somente quando os animais foram submetidos apenas uma vez ao LCE, existindo assim uma enorme importância na construção do mesmo.

Anseloni *et al.* (1995) compararam a atividade exploratória de ratos submetidos ao LCE com paredes opacas ou transparentes. Os autores notaram que os ratos preferem os BF tanto nos LCEs construídos com material transparente, como nos LCE construídos com paredes opacas, confirmando o comportamento natural de roedores em evitar espaços abertos.

Para a realização do experimento também deve ser considerada a luminosidade do ambiente onde está localizado o aparato e a intensidade de luz em cada braço do aparato (Pereira *et al.*, 2005). Quanto maior a diferença de luminosidade do ambiente, maior a

dificuldade do animal em distinguir diferença de iluminação entre os braços abertos e fechados, favorecendo a diminuição na exploração nos braços abertos. Estes autores sugerem que deve ser dada atenção especial ao material que constitui as paredes BF do LCE, assim como a fonte de iluminação ou a interação de ambos, para redução das variabilidades no teste LCE.

Outro fator que necessita de atenção são as características do animal experimental: linhagem, gênero e fases do ciclo estral, no caso da utilização de fêmeas (Hogg, 1996). Quanto às espécies, Rodgers *et al.* (1999) observaram que ratos demonstraram maior aversão ao braço aberto no LCE e menor atividade locomotora, em relação a camundongos. Embora ambas as espécies evitem os braços abertos, os camundongos Swiss-Webster gastam mais tempo na plataforma central, enquanto que ratos permaneceram por maior tempo nos braços fechados.

Quanto à linhagem, no estudo que validou o LCE, Pellow *et al.* (1985) demonstraram que as linhagens de ratos Lister e Wistar apresentavam o mesmo comportamento basal neste paradigma. Handley *et al.* (1993) também verificaram os mesmos índices de porcentagem e número total de entrada nos braços para estas mesmas linhagens. Griebel *et al.* (2000) compararam nove linhagens diferentes de camundongos *swiss*, BALB/c, C57BL/6, C3H, CBA, DBA/2, NMRI, NZB, SJL) utilizando LCE, após a administração de diazepam. As linhagens SJL, NMRI, CBA e C3H apresentam menores índices de ansiedade, e as linhagens BALB/c, *swiss*, CBA e C3H foram mais sensíveis ao diazepam.

Alguns estudos demonstraram os efeitos da diferença sexual sobre o comportamento animal no LCE, observando que as fêmeas são menos ansiosas que machos (Jonhston & File, 1990, Bridges & Starkey, 2004; Renard *et al.*, 2005, Hoffmann *et al.*, 2005). E, em fêmeas, com relação ao efeito do ciclo estral, Marcondes *et al.* (2001) observaram menores níveis de ansiedade no proestro, em relação ao diestro, no teste do LCE.

Os ratos apresentam uma tendência natural à exploração, quando confrontados com uma situação totalmente nova. Maslow (1963) propôs que o aumento da ansiedade e, conseqüentemente, do comportamento exploratório, foram induzidos pela falta de

informação do ambiente. Dessa forma, o conhecimento sobre o ambiente poderia reduzir os níveis de ansiedade do animal. Parra (1999) demonstrou que, a ansiedade induzida pelo LCE, levaria à diminuição desse comportamento em um espaço aberto e novo. Treit *et al.* (1993) fizeram uma exposição repetida dos ratos ao LCE para observar se o medo dos braços abertos habituariam depois de 18 triagens diárias consecutivas e notaram não houve habituação na evitação dos braços abertos, uma vez que não ocorreu aumento na evitação destes espaços.

Tem sido demonstrado que o estresse agudo, por choque elétrico, natação forçada, cirurgias e injeção de salina, alteram o comportamento de roedores submetidos ao LCE, induzindo respostas indicativas de aumento de ansiedade. Da mesma forma, a imobilização, a interação social e exposição ao odor de gato ou ao próprio gato, odores de outro animal da mesma espécie reduzem a exploração dos braços abertos no labirinto em cruz (Zangrossi, & File, 1992). Além disso, a entrada forçada ou voluntária nos braços abertos do LCE está associada com a elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona, aumentando comportamento de “freezing”, defecação e promovendo mudanças comportamentais e hormonais consideradas índice de ansiedade (Pellow *et al.*, 1985; Dumm e Berridge, 1990). A experiência de estresse e ansiedade ativa o eixo HPA, acompanhado de aumentos na secreção dos hormônios liberador de corticotrofina pelo hipotálamo, adrenocorticotrofina pela hipófise e corticosterona (cortisol) pela adrenal (Dunn & Berridge, 1990).

Com relação à validação do teste do LCE, vários estudos mostram a sensibilidade deste modelo experimental a agentes ansiolíticos. Pellow *et al.* (1985), utilizando o LCE, mostraram que o diazepam e o clordiazepóxido aumentam a quantidade de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Em outro estudo, os benzodiazepínicos, nitrazepan e midazolan promoveram aumentos nos mesmos índices, bem como na chegada ao final dos braços abertos, os quais foram revertidos pelos antagonistas dos receptores gabaérgicos pentilenotetrazol e FG 7142 (Cruz *et al.*, 1994; Rodgers *et al.*, 1998). Anseloni *et al.* (1995) também observaram que a administração de midazolan promoveu um aumento nos índices de ansiedade, porém, utilizando o LCE transparente.

Martin *et al.*, (2002) investigaram os efeitos do antagonista seletivo 5-HT_{2c}, o SB-242084 no LCE. Estes pesquisadores observaram que, além de induzir um pequeno aumento na atividade locomotora, demonstrada pelo aumento de transições nos braços fechados, e no tempo de permanência e na distância percorrida nos braços abertos, o que é consistente com efeito ansiolítico deste antagonista.

Pinheiro *et al.* (2002) investigaram os efeitos de injeções intra-amigdalóides de RP62203, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}. Neste estudo foram observados aumentos nas porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos indicando efeito ansiolítico do RP62203 administrado na porção basolateral da amígdala. Em doses elevadas, este antagonista promoveu um aumento no número de explorações da extremidade dos braços abertos. Não foi observada alteração no número de entradas nos braços fechados, indicando que não houve alterações na atividade locomotora. Os resultados de Pinheiro *et al.* (2002) dão suporte para a hipótese serotoninérgica clássica da ansiedade, uma vez que, a exposição de ratos ao LCE pode ativar o sistema serotoninérgico proveniente do núcleo dorsal da Rafe em direção a amígdala, aumentando o estado de ansiedade.

No presente estudo, o paradigma comportamental escolhido foi o teste do LCE, por estar baseado em comportamento inato e portanto não exigir estímulos que pudessem induzir estresse nos animais, por sua simplicidade metodológica, e por ser um modelo amplamente validado na literatura para a avaliação do nível de ansiedade em roedores.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do esteróide anabólico decanoato de nandrolona sobre o nível de ansiedade em ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos machos Wistar, padrão sanitário SPF ("specific pathogen free"), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP, com 30 dias de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por no mínimo um mês até completarem dois meses de idade, em número de quatro por gaiola, em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 h, luzes ascendendo às 6h00, com alimentação e água à vontade (Rosland, 1991).

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob o número de protocolo 754-1 (ANEXO 1).

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: 1) Controle, 2) Veículo, 3) Nandrolona, 4) Controle + diazepam, 5) Veículo + diazepam e 6) Nandrolona + diazepam (Tab.1). Os animais dos grupos veículo e nandrolona foram tratados com propilenoglicol ou decanoato de nandrolona, respectivamente, durante seis semanas. Os animais do grupo controle foram submetidos somente aos procedimentos relacionados à limpeza das gaiolas, e troca de ração e água, por igual período. Como a aplicação repetida de veículo ou EAA poderia induzir algum grau de estresse nos animais, a comparação entre os grupos controle e veículo permitiu a avaliação da influência do desconforto causado pelas repetidas injeções permitindo uma análise mais precisa dos efeitos do EAA. Ao final de seis semanas, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, para avaliação do nível de ansiedade.

Para validação farmacológica dos resultados comportamentais, outros animais submetidos aos tratamentos acima, foram tratados com o agente ansiolítico Diazepam, 30

min antes da aplicação do teste do labirinto em cruz elevado. A seqüência dos procedimentos experimentais no dia da análise comportamental está ilustrada na Figura 1.

Tabela 1. Grupos experimentais realizados para análise do efeito da nandrolona sobre as respostas ao teste do labirinto em cruz elevado.

Grupos experimentais
Controle
Veículo
Nandrolona
Controle + Diazepam
Veículo + Diazepam
Nandrolona + Diazepam

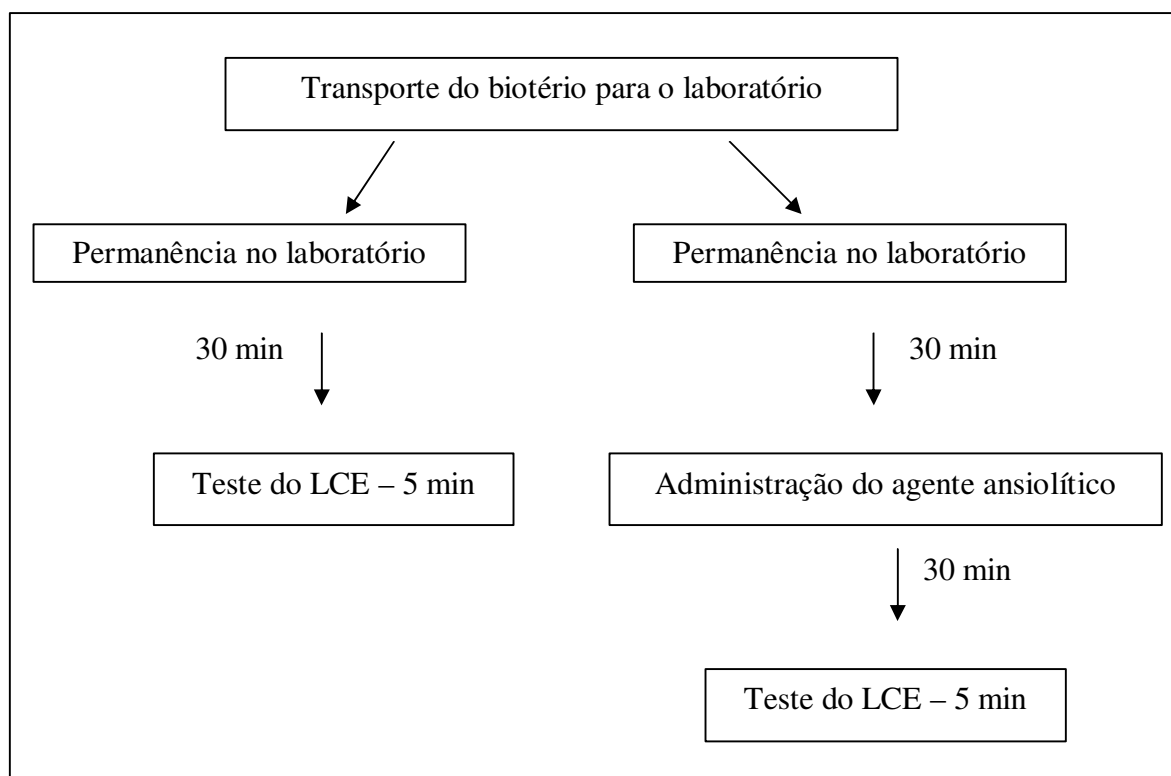


Figura 1. Seqüência experimental para a análise do nível de ansiedade, e validação farmacológica dos experimentos comportamentais, em ratos controle, tratados com veículo ou nandrolona.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no período da tarde, entre 14h00 e 15h00. Os animais dos grupos veículo e esteróide anabólico receberam respectivamente uma injeção i.m. de veículo (propilenoglicol 0,2 ml/Kg) ou de decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin® - 5mg/Kg) (Cunha *et al.* 2005 a, b), duas vezes por semana (as segundas e quintas-feiras) entre 14h00 e 14h30 h, durante 6 semanas. Esta dose de EAA é equivalente àquela geralmente utilizada em academias, sem prescrição médica: 600mg/semana ou aproximadamente 8mg/Kg/semana (Pope & Katz, 1988; Norton *et al.*, 2000).

Os animais foram pesados, uma vez/semana, e o teste do labirinto em cruz elevado foi realizado 24 horas após a última administração de veículo ou nandrolona ou período equivalente para o grupo controle (Fig.1). Para validação farmacológica dos resultados comportamentais, alguns animais foram tratados com diazepam (1mg/Kg i.p.), 30 min antes do teste comportamental (Pellow *et al.*, 1985; Viana *et al.*, 1994).

4.3. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O labirinto, (Fig.2) construído em madeira, apresenta uma altura de 50 cm, e dois braços abertos e opostos (50x10cm), cruzados em um ângulo reto por dois braços de mesma dimensão fechados por paredes de 40cm de altura, mas com a porção superior aberta (Marcondes *et al.*, 2001) . Uma borda de acrílico, com altura de 1cm, envolve os braços abertos para evitar a queda dos animais. Esse teste comportamental foi realizado em uma sala iluminada artificialmente (300 lux), e com isolamento térmico e acústico.

Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste comportamental, sendo colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados e, observado durante 5 minutos (Pellow *et al.*, 1985; Setem, 2000; Marcondes *et al.*, 2001). Seu comportamento foi filmado e posteriormente analisado por outro pesquisador treinado e calibrado para tal, de forma que o mesmo não sabia a que tipo de tratamento o animal havia sido submetido, sendo, portanto um experimento cego. Foi registrado o tempo de exploração dos braços abertos e fechados e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Uma entrada em cada braço foi considerada quando o animal colocou as quatro patas em um braço aberto ou fechado (Pellow *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1994).

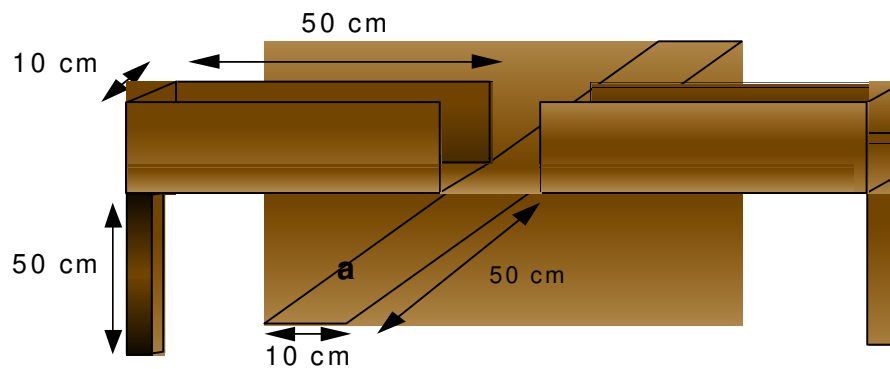


Figura 2. Labirinto em cruz elevado.

Os resultados foram convertidos posteriormente em:

- 1) Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (%TBA) ($100 \times \frac{\text{tempo (s) nos braços abertos}}{\text{tempo total de observação}}$)
- 2) Porcentagem de entradas feitas nos braços abertos (%EBA) ($100 \times \frac{\text{nº de entradas nos braços abertos}}{\text{nº total de entradas}}$)
- 3) Nº de entradas feitas nos braços fechados (EBF).

A porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade. A porcentagem de entradas nos braços abertos está relacionada tanto com a atividade locomotora quanto com a ansiedade (Cruz *et al.*, 1994). Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (Pellow *et al.*, 1985; Cruz *et al.*, 1994).

Os seguintes parâmetros propostos por Cruz *et al.* (1994) e Rodgers *et al.* (1999) também foram avaliados (Setem, 2000):

Número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto.

Avaliação de risco - comportamento de conflito do animal.

O número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. A avaliação de risco está diretamente relacionada com o nível de ansiedade e é medido pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro braço.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizada Análise de Variância bifatorial, considerando dois fatores: tratamento e diazepam. O fator tratamento apresentou 3 níveis, referentes ao tratamento recebido pelos animais durante 6 semanas: controle, veículo e nandrolona. O fator denominado diazepam refere-se ao tratamento, ou não, com diazepam 30 minutos antes da realização do teste do labirinto em cruz elevado. Quando valores de F indicaram significância estatística, o Teste de Tukey para comparações múltiplas das médias foi utilizado para identificação dos grupos diferentes. Valores de $p < 0,05$ foram indicativos de significância estatística.

5. RESULTADOS

Na figura 3 estão apresentados os dados referentes à porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado, por ratos controles, e ratos tratados com veículo ou nandrolona. Animais tratados com nandrolona apresentaram diminuição significativa neste parâmetro ($1,46 \pm 0,49$) em relação aos grupos controle ($3,80 \pm 0,97$) e veículo ($3,96 \pm 0,85$; $p < 0,05$), sem diferença entre os grupos controle e veículo ($p > 0,05$).

Os animais dos grupos controle e veículo, tratados com diazepam, não apresentaram diferença entre si, ou em relação aos respectivos grupos não tratados com diazepam, neste parâmetro. Porém, nos animais tratados com nandrolona, o diazepam aumentou significativamente a porcentagem de tempo nos braços abertos ($3,84 \pm 0,90$) em relação aos animais tratados somente com nandrolona. Animais tratados com nandrolona e diazepam não apresentaram diferença na porcentagem de tempo nos braços abertos, em relação aos grupos controle e veículo tratados ou não com diazepam ($p > 0,05$).

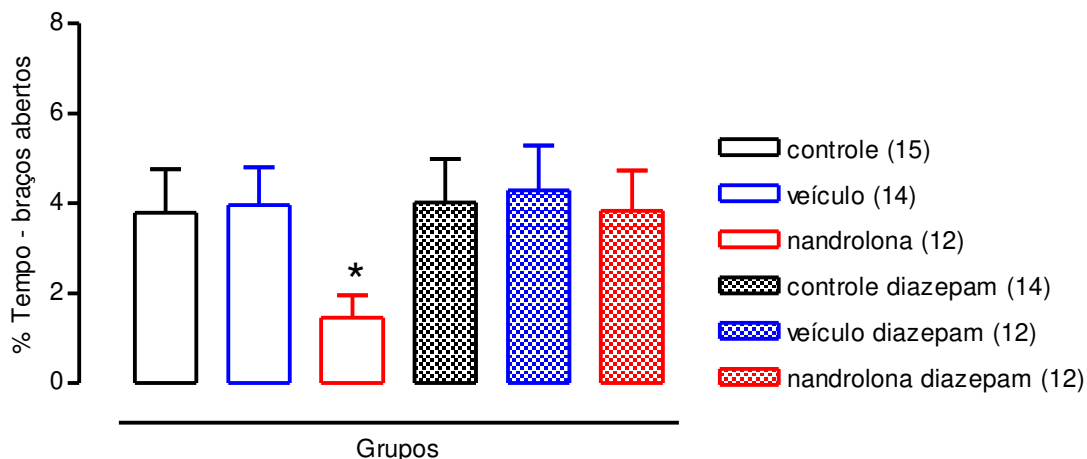


Figura 3. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle, veículo e nandrolona, tratados ou não com diazepam. O número de animais está indicado entre parênteses. O símbolo * significa diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

O efeito do tratamento com nandrolona sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos está representado na figura 4. Houve redução significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos do grupo tratado com nandrolona ($6,00 \pm 1,67$) quando comparado aos grupos controle ($16,75 \pm 3,30$) e veículo ($15,06 \pm 2,80$), sem diferença entre os grupos controle e veículo. O tratamento com diazepam reverteu esse efeito nos animais tratados com nandrolona ($15,25 \pm 1,58$; $p < 0,05$). Porém a administração de diazepam não promoveu alteração neste parâmetro, para os animais dos grupos controle ($15,53 \pm 2,26$) e veículo ($16,14 \pm 1,81$; $p > 0,05$).

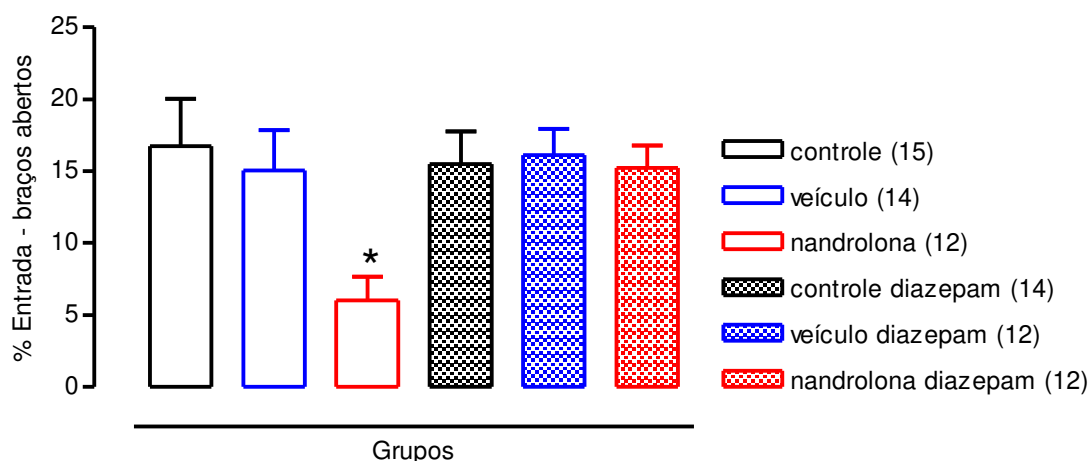


Figura 4. Porcentagem de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle, veículo e nandrolona, tratados ou não com diazepam. O número de animais está indicado entre parênteses. O símbolo * significa diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

A figura 5 ilustra o efeito do tratamento com esteróide anabólico e diazepam sobre o número de entradas realizadas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado, para todos os grupos estudados. Não foi observada diferença entre os grupos controle ($4,80 \pm 0,48$), veículo ($5,14 \pm 0,65$) e nandrolona ($5,16 \pm 0,70$; $p > 0,05$). O tratamento com diazepam também não promoveu nenhum efeito significativo nos grupos controle ($5,85 \pm 0,68$) ou tratados com veículo ($5,08 \pm 0,62$) e nandrolona ($4,67 \pm 0,48$; $p > 0,05$).

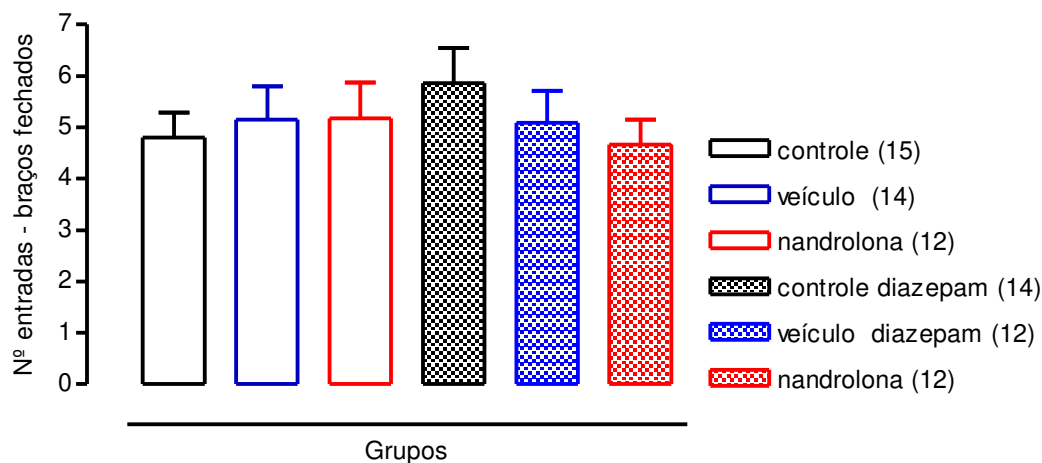


Figura 5. Número de entradas nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle, veículo e nandrolona, tratados ou não com diazepam. O número de animais está indicado entre parênteses.

Na figura 6 estão apresentados os resultados referentes ao número de idas ao fim dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, de animais dos grupos controle ($0,60 \pm 0,21$), veículo ($0,43 \pm 0,17$) e nandrolona ($0,41 \pm 0,19$). Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$). O tratamento com diazepam também não promoveu nenhum efeito significativo nos grupos controle ($0,50 \pm 0,20$), veículo ($0,67 \pm 0,19$) e nandrolona ($0,67 \pm 0,19$; $p > 0,05$).

Os dados referentes à avaliação de risco dos grupos analisados neste trabalho estão indicadas na figura 7. Não houve diferenças na avaliação de risco entre os grupos controle ($2,53 \pm 0,43$), veículo ($2,21 \pm 0,19$) e nandrolona ($2,67 \pm 0,22$; $p > 0,05$). O tratamento com diazepam também não promoveu nenhum efeito significativo nestes grupos: controle ($2,45 \pm 0,16$), veículo ($2,33 \pm 0,53$) e nandrolona ($2,33 \pm 0,33$; $p > 0,05$).

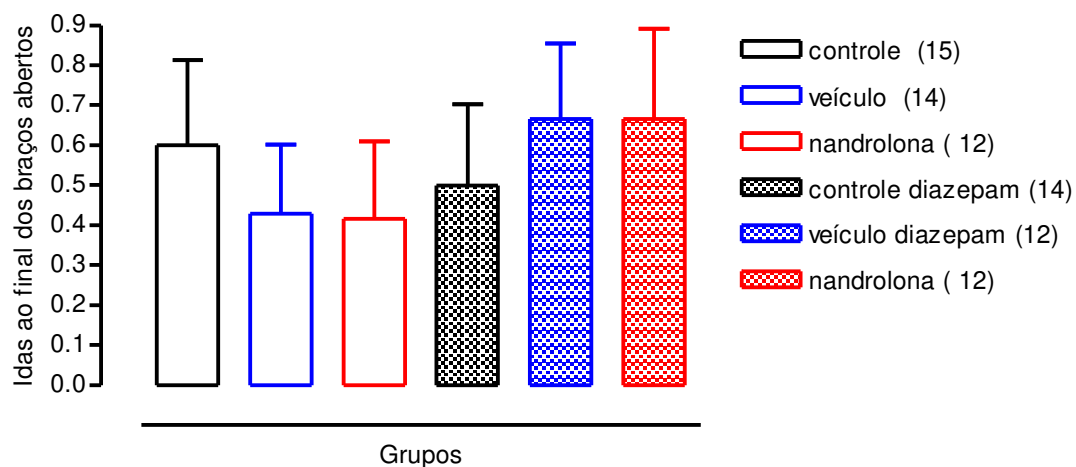


Figura 6. Idas ao final dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle, veículo e nandrolona, tratados ou não com diazepam. O número de animais está indicado entre parênteses.

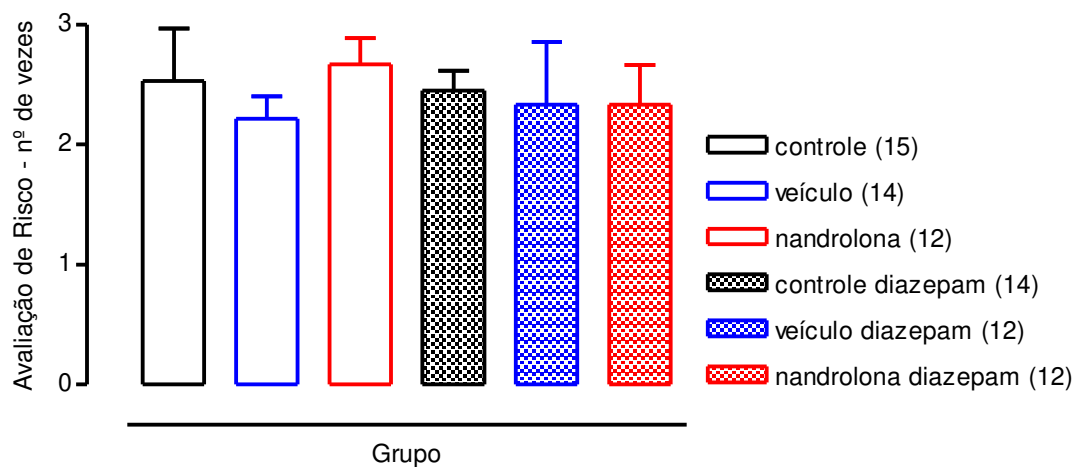


Figura 7. Avaliação de risco no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle, veículo e nandrolona, tratados ou não com diazepam. O número de animais está indicado entre parênteses.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram que o tratamento com o EAA decanoato de nandrolona, induziu aumento nos níveis de ansiedade em ratos. O efeito ansiogênico do EAA decanoato de nandrolona foi evidenciado pela diminuição na porcentagem de tempo e de entradas realizadas nos braços abertos por ratos tratados durante 6 semanas com este hormônio anabolizante, em relação aos animais controle e àqueles tratados com veículo.

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) está baseado na exploração de um ambiente desconhecido pelo animal. Como a exploração do labirinto envolve o deslocamento do animal, qualquer fator que possa alterar sua atividade locomotora pode comprometer a análise comportamental. O fato de não ter havido diferença, entre os grupos controle, veículo e nandrolona, no número de entradas realizadas nos braços fechados mostra que os tratamentos utilizados não alteraram a atividade locomotora dos animais. Logo, a não alteração no número de entradas nos braços fechados confirma que a menor porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, observados no grupo tratados com nandrolona, reflete aumento na ansiedade, e não está relacionada à diminuição na atividade locomotora.

A não alteração da atividade locomotora observada em nosso estudo confirma a observação de Salvador *et al.* (1999). Estes autores relataram que o tratamento agudo ou crônico, com decanoato de nandrolona e propionato de testosterona, isoladamente ou combinados, não alteraram a atividade locomotora de camundongos.

Como não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, ou no número de entradas nos braços fechados, entre os grupos controle e veículo, nossos dados também indicam que este efeito ansiogênico se deve, de fato, a nandrolona, e não foi influenciado pela aplicação de repetidas injeções, o que pode representar um estímulo desagradável e estressante.

Estes resultados comportamentais foram validados farmacologicamente pela utilização do agente ansiolítico diazepam. O efeito de compostos benzodiazepínicos em modelos animais já está bem estabelecido. Para a validação do teste do LCE, como uma ferramenta experimental para o estudo da ansiedade, Pellow *et al.* (1985), mostraram que

este modelo é sensível a agentes ansiolíticos, tais como o diazepam e o clordiazepóxido, um dos primeiros compostos benzodiazepínicos. Estes aumentam a frequência de entradas e de tempo nos braços abertos, em animais que apresentam elevação no nível de ansiedade. No teste do LCE, o diazepam constitui o fármaco padrão para validar as respostas comportamentais.

No presente estudo, a administração de diazepam, 30 min antes da realização do teste do LCE, anulou o efeito ansiogênico do esteróide anabólico. Isto foi evidenciado pela observação de que o comportamento de ratos tratados com nandrolona e diazepam não diferiu daquele apresentado por animais controles ou tratados com veículo, sem administração de diazepam. Além disso, o diazepam não alterou as respostas dos grupos controle e veículo, como era esperado, já que sua ação é evidenciada somente na presença de aumento de ansiedade (Pellow *et al.*, 1985). Portanto, os resultados obtidos nos grupos tratados com diazepam validam a interpretação de que as alterações observadas na resposta ao teste do LCE, em ratos tratados com nandrolona, são indicativas de aumento nos níveis de ansiedade (Pellow *et al.*, 1985).

Porém, apesar deste efeito ansiogênico da nandrolona ter sido evidenciada nos parâmetros clássicos avaliados no teste do LCE (porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados), as outras variáveis propostas na literatura (Rodgers *et al.*, 1998) e utilizadas no presente estudo não foram alteradas (número de idas ao fim dos braços abertos e avaliação de risco). O número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade (Rodgers *et al.*, 1998), e a avaliação de risco, medida pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto sem entrar em outro braço, é diretamente proporcional à ansiedade (Cruz *et al.*, 1994, Rodgers *et al.*, 1998). Uma explicação para este resultado aparentemente contraditório é que, em modelos animais, as variáveis apresentam diferentes graus de sensibilidade aos tratamentos experimentais. Assim, sugerimos que a avaliação de risco e a exploração do fim do braço aberto possam não ser sensíveis aos efeitos do decanoato de nandrolona, na dose e tempo de tratamentos aqui utilizados.

O efeito ansiogênico do decanoato de nandrolona está de acordo com o estudo de Minkin *et al.* (1993). Estes autores observaram que o tratamento com uma variação de

doses, do mesmo EAA, no intervalo de 0,10 a 50 mg/Kg, durante oito semanas, também produziu efeitos ansiogênicos em ratos, no teste do campo aberto. Os ratos tratados com altas doses de nandrolona gastaram maior tempo nas margens do campo aberto, o qual é um índice de ansiedade neste modelo comportamental. (Minkin *et al.* 1993).

Porém, outros estudos têm sugerido um efeito ansiolítico promovido pelos EAA, em diferentes testes comportamentais, doses e substâncias utilizadas.

Aikey *et al.* (2002) observaram uma resposta ansiolítica em camundongos, representada pelo aumento do número de exploração dos braços abertos, sem alteração da atividade locomotora, no teste do LCE, trinta minutos após aplicação de dose única de testosterona ou do metabólico da testosterona 3- α -androsterona-nediol. Bing *et al.* (1998), trataram ratos Wistar com dose única de testosterona (5mg/Kg), 24 horas antes do teste do conflito de Vogel, que consiste em treinar ratos, em restrição hídrica, a lambem um tubo com água, em uma câmara operante. Após o treinamento, cada lambida é acompanhada de choque elétrico e os números de choques recebidos são registrados, sendo inversamente proporcional à ansiedade. Os autores observaram que os ratos tratados com testosterona aceitavam mais choques do que animais não tratados. Esse dado é consistente com a ação ansiolítica da testosterona, demonstrada pelo aumento da ingestão hídrica punitiva em relação ao controle. A observação de que a testosterona aumentou a resposta punitiva em ratos, suporta a teoria de que o paradigma ante conflito pode refletir não somente a ansiedade mas, também impulsividade. Britan *et al.* (1993) relataram que o tratamento com propionato de testosterona, durante 6 dias, promoveu um aumento na exploração nos braços abertos do LCE, em relação ao controle, indicando redução no nível de ansiedade. Porém, no mesmo trabalho, o tratamento durante 14 dias não promoveu efeitos ansiolíticos. Segundo estes autores, esta variação de respostas se deve ao desenvolvimento de tolerância ao EAA, muito comum em usuários crônicos de drogas psicoativas. A linhagem de ratos utilizada por esses autores foi ratos Long-Evans e a administração do esteróide foi subcutânea, através de implantes de silicone para administração prolongada de doses suprafisiológicas. Em nosso estudo, a administrações i.m. de nandrolona, duas vezes por semana, durante 6 semanas, reduziu a exploração dos braços abertos em ratos Wistar.

O aparente conflito entre nossos resultados e estes estudos que descreveram efeitos ansiolíticos de EAA provavelmente estão relacionados ao uso de modelos experimentais distintos, que podem ativar diferentes vias neurais, e de linhagens diferentes, que podem apresentar diferença de sensibilidade ao agente ou ao teste comportamental utilizados. E, como a manipulação da molécula original de testosterona, para a formulação dos EAA, influencia sua farmacocinética, biodisponibilidade e / ou o balanço das atividades androgênica, anabólica (Cunha *et al.*, 2004), as diferenças na estrutura química, nas vias de metabolização e mecanismos de ação dos EAA sintéticos, também poderiam explicar a ocorrência de diferentes efeitos comportamentais.

É bem conhecido que os neuroesteróides como a pregnenolona, tetrahydroprogesterona, tetrahydrodeoxycorticosterona, metabólitos da testosterona, progesterona e deoxicorticosterona podem exercer efeitos centrais através da modulação dos receptores neuronais GABA_A (Evans, 1988; Majewska *et al.*, 1986; Rupprecht & Holsboer, 1999; Baulieu, 1991). Estudos recentes indicam o seu envolvimento em diversos processos fisiológicos e comportamentais, tais como excitabilidade, sensibilidade à dor, agressão, alimentação, comportamento sexual, memória e efeitos ansiolíticos.

Neste sentido, Rodgers & Johnson (1995) observaram que os neuroesteróides, 5 α -3 α -tetrahydrodeoxycorticosterona, 5 α -dihidroprogesterona, 5 β -dihidroprogesterona, pregnenolona e alopregnenolona, produzem efeitos ansiolíticos em camundongos no LCE.

Os EAA agem em um mesmo tipo de receptor intracelular de androgênios. As diferentes ações destes hormônios se devem a afinidade diferencial do receptor pelos diferentes hormônios, e às variações na densidade deste receptor nos tecidos alvos (Wu *et al.*, 1997, Wilson, J.D, 1988; Lise *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2004). Como os EAA são substratos de distintas vias de metabolização, e dão origem a diferentes metabólitos, suas ações nos tecidos periféricos e no Sistema Nervoso Central (SNC), envolvem não somente o composto principal, mas também compostos derivados. Conseqüentemente, múltiplos mecanismos parecem estar relacionados às diferentes ações comportamentais dos EAA em animais e em humanos (Britan *et al.*, 1996; Hoggs, 1996; Weiss *et al.*, 1998 Clark & Henderson, 2006; Fernandez-Guasti & Matiniz-Mota, 2005; Henderson *et al.*, 2006).

A testosterona e alguns EAA sintéticos, por ação da 5α -redutase, são convertidos a diidrotestosterona (DHT). No SNC, a 5α -redutase é encontrada em maior concentração no hipotálamo e mesencéfalo, e em menores níveis na amígdala, hipocampo, cerebelo e córtex cerebral (Melcangi *et al.*, 1990). Embora a nandrolona também seja substrato para a enzima 5α -redutase, o metabólito resultante, ao contrário da DHT, tem baixa afinidade pelo receptor androgênico e esta conversão ocorre principalmente nos órgãos sexuais (Cunha *et al.*, 2004). Assim, os efeitos comportamentais do decanoato de nandrolona não estariam relacionados à sua conversão a DHT.

Os androgênios também apresentam funções importantes na regulação comportamental e nas características sexuais que envolvem a aromatização da testosterona em estrogênios em nível cerebral (Bates *et al.*, 2005). A conversão da testosterona a estrógeno é mediada pela enzima aromatase, que está presente em áreas cerebrais como hipotálamo, pré-óptica e no sistema límbico, estruturas envolvidas no controle das funções reprodutivas, reações emocionais, aprendizado e regulação endócrina (Poletti *et al.*, 1997). Ao contrário da testosterona, o decanoato de nandrolona é um androgênio não – aromatizável (Hobbs *et al.*, 1996), o que inclusive justifica a sua ampla utilização, pois esta característica resulta em diminuição dos efeitos feminilizantes dos EAA (Kuhn, 2002).

Sabe-se que a progesterona e os estrógenos modulam os níveis de ansiedade em ratos e em humanos (Picazo & Fernandez, 1995; Ruppresht & Holsboer, 1999), por meio de suas ações sobre a síntese e metabolismo de neurotransmissores (McEwen *et al.*, 1991), a atividade e número de receptores para agentes ansiolíticos e ansiogênicos (Britan & Dowd, 1996; Ruppresht & Holsboer, 1999).

O efeito ansiolítico de esteróides androgênicos anabólicos também foi demonstrado por Fernandez-Guasti & Matiniz-Mota (2005) em ratos castrados, tratados, por via subcutânea, com diferentes doses de propionato de testosterona (0,25, 0,5 e 1,0mg/rato) e dos seus metabólitos androstenediona e 3α -androstane- 20α -diol (0,25 ou 0,5mg/rato). Para avaliar participação dos receptores androgênicos e benzodiazepínicos na ação ansiolítica do propionato de testosterona, os ratos castrados e tratados com veículo ou anabolizante receberam doses diárias do antagonista de receptores androgênicos flutamida,

durante sete dias e injeção única do antagonista gabaérgico flumazenil, trinta minutos antes do teste de enterro. O tratamento com propionato de testosterona e seus metabólitos produziu efeito ansiolítico após administração crônica. Este efeito ansiolítico foi inibido pela flutamida, mas não pelo flumazenil. Os autores sugeriram que a ação ansiolítica do propionato de testosterona é mediado por receptores GABA_A e que ausência de efeito do flumazenil poderia ser decorrente do horário de administração do antagonista gabaérgico e do propionato de testosterona (Fernandez-Guasti & Matíniz-Mota, 2005). Considerando que os receptores de androgênios também respondem aos estrógenos, e que o tratamento utilizado poderia resultar em aumento na taxa de aromatização da testosterona, o efeito ansiolítico observado pode estar relacionado a uma ação estrogênica, e não a efeitos androgênicos diretos.

Marcondes *et al.* (2001), ao estudarem a influência do ciclo estral sobre o nível de ansiedade em ratas submetidas no labirinto em cruz elevado durante as quatro fases do ciclo estral, relataram que ratas em proestro apresentaram menores níveis de ansiedade do que no diestro. No proestro, são observados os maiores níveis de estradiol, em oposição aos menores níveis destes hormônios encontrados durante o diestro. O tratamento de fêmeas, na fase de diestro, com estradiol induziu um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos, cancelando a diferença observada entre esta fase e o proestro, confirmando a ação ansiolítica do estradiol.

Assim, os efeitos ansiolíticos observados por outros autores, e que aparentemente divergem daqueles observados no presente estudo, poderiam ser decorrentes da conversão de EAA a estrógenos. E, como o decanoato de nandrolona não sofre ação da enzima aromatase, não evidenciamos efeitos ansiolíticos no presente estudo.

Um dos mecanismos de ação que poderiam estar envolvidos no aumento dos níveis de ansiedade induzido pelo decanoato de nandrolona poderia ser sua ação no núcleo central da amígdala. Em cobaias, foi observado que o tratamento com nandrolona aumentou a expressão da proteína C-Fos nesta região (Johansson-Steensland *et al.*, 2002), a qual está relacionada com o controle da ansiedade, e também de comportamentos agressivos (Siegel *et al.*, 1999).

Uma vez que os EAA em altas doses (1mg/Kg) também se ligam a receptores de glicocorticóides (Friedel *et al.*, 2006), as ações do decanoato de nandrolona também poderiam estar relacionadas à sua ação sobre estes receptores. Os glicocorticóides podem atuar na modulação da ansiedade (Oliveira *et al.* 2006), por suas ações no SNC e principalmente no hipocampo (Herrerro *et al.*, 2006).

No presente estudo, não avaliamos o mecanismo envolvido na ação ansiogênica do decanoato de nandrolona, porém as estruturas relacionadas a este efeito, bem como suas implicações, merecem futuras investigações, já que o aumento nos níveis de ansiedade aqui observados poderiam estar relacionados ao aumento da agressividade e o desenvolvimento de distúrbios emocionais observados, com frequência, em usuários de EAA (Lise *et al.*, 1999; Breuer *et al.*, 2001).

O decanoato de nandrolona é um dos EAA mais utilizados por atletas, e também por adolescentes, em vários países do mundo e também no Brasil (Cunha *et al.* 2004; Pizzol *et al.*, 2006). Em um estudo realizado com estudantes do ensino fundamental e médio, de escolas públicas e privadas, na região Sul do Brasil, observou-se que entre os medicamentos mais utilizados, de forma abusiva, citam-se os ansiolíticos, anfetaminas, anabolizantes e barbitúricos (Lucas *et al.*, 2006; Pizzol *et al.*, 2006). Outros autores observaram uma maior prevalência na utilização, entre as meninas, de ansiolíticos e anfetaminas, enquanto nos meninos, houve maior utilização de anabolizantes (Magalhães *et al.* 1991; Boskovitz *et al.* 1995; Galduroz *et al.*, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados entre estudantes universitários (Barcellos *et al.* 1997). Também foi verificado nestes estudos que esses indivíduos obtinham fácil acesso aos medicamentos em farmácias e academias, e que o seu uso era geralmente indicado por parentes ou amigos.

Como o estado emocional de um indivíduo, influencia a sua memória e a sua capacidade de aprendizado (Hariri *et al.* 2003), e o uso de EAA é freqüente entre indivíduos em idade escolar, torna-se evidente a necessidade de se compreender os mecanismos subjacentes aos efeitos ansiogênicos do decanoato de nandrolona.

Portanto, considerando os efeitos colaterais comprovados do uso de altas doses de EAA, os questionamentos sobre seus potenciais efeitos sobre o desempenho atlético, a importância do conhecimento sobre os riscos decorrentes do uso de EAA torna-se cada vez

maior à medida que cresce o uso ilícito e abusivo destas substâncias (Mottram & George, 2000; Iriart & Andrade, 2002; Cunha *et al.* 2004, Cunha *et al.* 2005; Cunha *et al.* 2006; Pizzol *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÃO

O esteróide androgênico anabólico, administrado em alta dose, apresentou efeito ansiogênico em ratos.

REFERÊNCIAS

- Andrade L H S G Gorenstein C. Aspectos gerais da escala de avaliação de ansiedade. *Revista psiq. Clin.* 1998; 25 (6), 285-290.
- Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Horm Behav.* 2002 ; 42(4):448-460.
- Anseloni VZ, Motta V, Lima G, Brandão ML. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz J Med Biol Res.* 1995 ; 28(5):597-601.
- Bahrke MS, Yesalis CE, Kopstein AN, Stephens JA. Risk factors associated with anabolic-androgenic steroid use among adolescents. *Sports Med.* 2000; 29(6):397-405.
- Ballal, SH, Domoto, DT, Polack, DC, Marciulonis, P & Martin, KJ. Androgens potentiate the effects of erythropoietin in the treatment of anemia in patients on chronic hemodialysis. *Am J. Kidney Dis.* 1991; 17: 29-33.
- Barcellos AP, Paggi AP, Silva DB, Campagnolo MI, Dieterich MDD, Santos RLR, et al. Padrão de consumo de anfetaminas entre universitários de Porto Alegre. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul* 1997; 19:161-21.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABA ergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry.* 2003; 8.(8): 721-737.
- Baulieu EE. The steroid hormone antagonist RU486. Mechanism at the cellular level and clinical applications. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1991;20(4):873-891.
- Bates, KA *et al.* Androgens, andropause and neurodegeneration: exploring the link between steroidogenesis, androgens and Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 281-292.
- Bateson AN. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des.* 2002;8(1):5-21.
- Berns JS, Rudnick MR, Cohen RM. A controlled trial of recombinant human erythropoietin and nandrolone decanoate in the treatment of anemia in patients on chronic hemodialysis. *Clin Nephrol.* 1992 ; 37(5):264-267.

Bing O, Heilig M, Kakoulidis P, Sundblad C, Wiklund L, Eriksson E. High doses of testosterone increase anticonflict behaviour in rat.. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1998 ; 8(4):321-323.

Bitran, D, Kellog, CK, Hilvers, RJ. Treatment with an anabolic-androgen steroid affects anxiety-related behaviour and alters the sensitivity of cortical GABA_A receptors in the rat. *Horm. Behav*, 1993; 27: 568-583.

Bitran D, Dowd JA. Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996; 125(1):65-73.

Boskovitz EP, Cruz ETN, Neto FC, Moraes MS, Netto JVP, Ávila LA, *et al*. Uso de drogas entre estudantes universitários em São José do Rio Preto, São Paulo. *Rev Bras Psiquiatr*. 1995; 22:87-93.

Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, Possidente BP. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. *Horm Behav*. 2001; 40(3):409-418.

Bridges NJ, Starkey NJ. Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiol Behav*. 2004; 83(1):119-127.

Brower, KJ, Eliopulus, GA, Blow, FC, Catlin, D. H. & Beresford, T. P. Evidence for physical and psychological dependence on anabolic androgenic steroids in eight weight lifters. *Am. J. Psychiatry*. 1990; 147: 510-512.

Brown JS, Kalish JW, Faber LE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *Exp Psychol*. 1951; 41(5):317-28.

Buckley WE, Yesalis CE 3RD, Friedl KE, Anderson WA, Streit AL, Wright JE. Estimated prevalence of anabolic steroid use among male high school seniors. *JAMA*. 1988; 16, 260(23): 3441-3445.

Buffett-Jerrott SE, Stewart SH. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine use. *Curr Pharm Des*. 2002; 8(1): 45-58.

Celotti F, Negri Cesi P. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 43(5): 469-477.

- Clark AS, Henderson LP. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003; 27(5): 413-436.
- Clarkson PM, Thompson HS. Drugs and sport. Research findings and limitations. *Sports Med.* 1997; 24(6): 366-384.
- Conway AJ, Handelsman DJ, Lording DW, Stuckey B, Zajac JD. Use, misuse and abuse of androgens. The Endocrine Society of Australia consensus guidelines for androgen prescribing. *Med J Aust.* 2000; 172(5):220-224.
- Copeland J, Peters R, Dillon P. Anabolic steroids use disorder among a sample of Australian competitive and recreational users. *Drug Alcohol Depend.* 2000; 60(1): 91-96.
- Corrigan B. Anabolic steroids and the mind. *Med J Aust.* 1996; 165(4): 222-226.
- Cowart VS. Ethical, as well as physiological, questions continue to arise over athletes' steroid abuse. *JAMA.* 1989; 261(23): 3362-3, 3367.
- Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1981; 15(5):695-699.
- Creutzberg EC, Schols, AMWJ. Anabolic steroids. Curr. Opin. *Clin Nutr Metab Care.* 1999; 2: 243-253.
- Crist, DM, Stackpole, PJ & Peake, G. T. Effects of androgenic anabolic steroids on neuromuscular power and body composition. *J. Appl. Physiol.* 1983; 54: 366-370.
- Cruz, APM., F. & Graeff, FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 49: 171-176.
- Cunha TS. *Efeito do esteróide anabólico androgênico nandrolona sobre o metabolismo do glicogênio em ratos sedentários e treinados.* Piracicaba. [Dissertação]. UNICAMP/FOP; 2004.
- Cunha TS., Cunha N.S., Moura M.J.C.S., Marcondes F.K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Rev Bras Ciênc Farmac.* 2004; 40(1) – no prelo.
- Cunha TS, Tanno AP., Moura M.J.C.S., Marcondes F.K. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.*, 2005a; 77(9): 1030-1043.

Cunha TS, Moura M.J.C.S., Bernardes C.F., Tanno A. P., Marcondes F.K. Vascular sensitivity to phenylefrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension*. 2005b; 46(2): 1010-1015.

Cunha TS, Tanno A.N, Marcondes, F.K.; Perez, S.E.A., Selistre-Araujo, H.S. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006; 50(3): 532-540.

Currier JS. How to manage metabolic complications of HIV therapy: what to do while we wait for answers. *AIDS Read*. 2000; 10(3): 162-169.

Daly RC, Su TP, Schmidt PJ, Pickar D, Murphy DL, Rubinow DR. Cerebrospinal fluid and behavioral changes after methyltestosterone administration: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*. 2001; 58(2):172-177.

Davis M, Cassella JV, Kehne JH. Serotonin does not mediate anxiolytic effects of buspirone in the fear-potentiated startle paradigm: comparison with 8-OH-DPAT and ipsapirone. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988; 94(1):14-20.

Dawson GR, Crawford SP, Collinson N, Iversen SD, Tricklebank MD. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995; 118(3): 316-323.

Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16(8): 260-1.

Dawson RT. Drugs in sport - the role of the physician. *J Endocrinol*. 2001; 170(1): 55-61.

Deakin JWF., Graeff, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *J.Psychopharmacol*.1991; 5: 305-315.

Deakin JWF., Graeff, F.G., Guimarães, F.S. 5-HT receptor subtypes and modulation of aversion. In: MARSDEN, C.A; FEAL, D. J., eds. Central serotonin receptors and psychotropic drugs. *Blackwell Scientific Publication*. 1992; 147-174.

Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF., Gold L.H.. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2000; 73(1): 31-48.

Delorey TM., Olsen RW. GABA and epileptogenesis: comparing gabrb3 gene-deficient mice with Angelman syndrome in man. *Epilepsy Res*. 1999; 36(2-3): 123-32.

DE Rose EH., Nobrega ACL. Drogas lícitas e ilícitas. In: **Ghorayeb N.** Barros TO. Exercício. São Paulo: Atheneu, 1999.

Durant, RH.; Rickert, VI; Ashworth, CS; Newman, C; Slavens, G. Use of multiples drugs among adolescents who use anabolic steroids. *N Engl J Med.*1993; 328: 922-926.

Dunn AJ., Berridge CW. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev.* 1990, 15(2):71-100.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988; 240 (4854): 889-895.

Fernandes C., File S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1): 31-40.

Fernández-Guasti A., Martinez-Mota L. (2005). Anxiolytic-like actions of testosterone in the burying behavior test: role of androgen and GABA-benzodiazepine receptors. *Psychoneuroendocrinology* 30; 762-770

File SE, Andrews N., Wu PY., Zharkovsky A., Zangrossi JR H. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur J Pharmacol.* 1992; 218(1): 9-14.

File SE., Baldwin HA, Aranko K. Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. *Brain Res Bull.* 1987 ;19(5):607-610.

File SE., Hyde JR. The effects of p-chlorophenylalanine and ethanolamine-O-sulphate in an animal test of anxiety. *J Pharm Pharmacol.* 1977; 29(12): 735-738.

File SE., Pellow S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br J Pharmacol.* 1985; 86(3): 729-735.

File SE., Wardill AG. The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacology.* 1975; 44(1): 47-51.

File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacology.* 1975; 44(1): 53-59.

- Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci Reattelli L, Turillazzi E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch Pathol Lab Med*. 2001; 125(2): 253-255.
- Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudénbach-Leschowsky U, Schanzer W, Thevis M, Vollmer G, Zierau O, Diel P. 17 β -hydroxy-5 α -androst-1-en-3-one (1-testosterone) is a potent androgen with anabolic properties. *Toxicol Lett*. 2006; 165(2): 149-155.
- Galduróz JC, Noto AR, Carlini EA. *Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras*. Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas. Escola Paulista de Medicina. (1997).
- Ghaphery NA. Performance-enhancing drugs. *Orthop Clin North Am*. 1995; 26(3): 433-442.
- Gordon, CM, Glowacki, J. & LeBoff, M.S. DHEA and the skeleton (through the ages). *Endocrine*. 1999; 11: 1- 11.
- Graeff, FG; Zangrossi, H. Animal models of anxiety disorders. *Biol. Psychiatry*. 2002; 1-15.
- Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das doenças mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos Editorial; 1999; 181.
- Graeff FG, Viana MB, MORA PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21(6): 791-9.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26(1): 67-70.
- Graeff FG, Schoenfeld RI. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970; 173(2): 277-83.
- Green, S. & Hodges, H. Animal models of anxiety. In: Behavioural models in *Psychopharmacology*. 1991, Willner, P. (ed.), Cambridge University Press: 21-49.
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000; 148(2):164-170.
- Gruber, A.J. & Pope Jr, H.G. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother. Psychosom*. 2000; 69: 19 –26.

- Handa JR, Price RH. Androgen Action. In: Fink G, editors. *Encyclopedia of Stress*. USA: Academic Press; 2000; 1: 183-188.
- Handelsman DJ. Estrogens and falling sperm counts. *Reprod Fertil Dev*. 2001; 13(4): 317-324.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984; 327(1): 1-5.
- Hensman R, Guimaraes FS, Wang M, Deakin JF. Effects of ritanserin on aversive classical conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991; 104(2): 220-224.
- Hariri A.R., Goldberg T.E., Mattay V.S., Kolachana B.S., Callicott J.H. Egan M.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J. Neurosci*. 23, 6690-6694.
- Henderson LP, Penatti CA, Jones BL, Yang P, Clark AS. Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. *Neuroscience*. 2006; 138(3): 793-799.
- Hensman R, Guimaraes FS, Wang M, Deakin JF. Effects of ritanserin on aversive classical conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991; 104(2): 220-224.
- Hobbs CJ, Jones RE, Plymate SR. Nandrolone, a 19-nortestosterone, enhances insulin-independent glucose uptake in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(4): 1582-1585.
- Hoberman D. Drug promotion. *N Engl J Med*. 1995; 332(15): 1031
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984; 20(4): 495-499.
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 54(1): 21-30.
- Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 1997; 36(4-5): 419-28.
- Imamura M, Prasad C. Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. *Physiol Behav*. 1998; 64(3): 415-417.

Iriart JA, Andrade TM. Body-building, steroid use, and risk perception among young body-builders from a low-income neighborhood in the city of Salvador, Bahia State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2002 ; 18(5): 1379-1387.

Insel TR, Akiskal HS. Obsessive-compulsive disorder with psychotic features: a phenomenologic analysis. *Am J Psychiatry*. 1986; 143(12): 1527-1533.

Insel TR, Hill JL, Mayor RB. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986; 24(5): 1263-127.

Johnson, WO. Steroids: a problem of huge dimensions. *Sports Illustrated*. 1985; 5 (13): 38-54.

Jorge-Rivera JC, McIntyre KL, Henderson LP. Anabolic steroids induce region- and subunit-specific rapid modulation of GABA(A) receptor-mediated currents in the rat forebrain. *J Neurophysiol*. 2000; 83(6): 299-309.

Kahn RS, Van Praag HM., Wetzler S., Asnis G., Barr G. Serotonin and anxiety revisited. *Biol Psychiatry*. 1988; 23: 189-208.

Korpi ER, Sinkkonen ST. GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol Ther*. 2006; 109(1-2): 12-32.

Kuhn, CM. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res*. 2002; 57: 411-434.

Kuipers H, Wijnen J.A, Hartgens F. & Willems, S.M. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int. J. Sports Med*. 1991; 12: 413-418.

Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med*. 2002; 32(5): 285-96.

Lancel M. Role of GABAA receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep*. 1999; 22(1): 33-42.

Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros HMT. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Rev Ass Med Bras*. 1999; 45(4): 364-370.

Lister RG. The benzodiazepine receptor inverse agonists FG 7142 and RO 15-4513 both reverse some of the behavioral effects of ethanol in a holeboard test. *Life Sci*. 1987 21; 41(12):1481-1490.

- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 1990;46(3):321-340. Review.
- Lucas ACS, Parente RCP, Picanço NS, Conceição DA, Costa KRC, Magalhães IRS, Siqueira JCA Uso de psicotrópicos entre universitários da área da saúde da Universidade Federal do Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2006; 22(3): 663-671.
- Magalhães MP, Barros RS, Silva MTA. Uso de drogas entre universitários: a experiência com a maconha como fator delimitante. *Rev ABP- APAL* 1991; 13:97-104.
- Mancuso CE, Tanzi MG, Gabay M. Paradoxical reactions to benzodiazepines: literature review and treatment options. *Pharmacotherapy.* 2004; 24(9): 1177-1185.
- Marcondes, FK, Miguel, KJ, Melo, LL & Spadari – Bratfisch, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 2001; 74 (4-5): 435-440.
- Marks IM, Nesse RM. Fear and fitness: an evolutionary analysis of anxiety disorders. *Ethology and Sociobiology.* 1994; 29: 157-169.
- Maslow AH. The need to know and the fear of knowing. *J Gen Psychol.* 1963; 68: 111-125.
- McEwen, B.S.: Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* 1991; 12:141-147.
- Melcangi RC, Celotti F, Ballabio M, Poletti A, Martini L. Testosterone metabolism in peripheral nerves: presence of the 5 alpha-reductase-3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase enzymatic system in the sciatic nerve of adult and aged rats. *J Steroid Biochem.* 1990; 35(1): 145-148.
- Middleman AB, Faulkner AH, Woods ER, Emans SJ, Durant RH. High-risk behaviors among high school students in Massachusetts who use anabolic steroids. *Pediatrics.* 1995; 96(2 Pt 1): 268-272.
- Mincis M. Interpretação da elevação sérica de enzimas hepáticas em pacientes assintomáticos. *Rev Bras Med.* 2001; 58(4): 38-46.
- Minkin, DM, Meyer, ME & Haaren, F. Behavioral effects of long-term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. *Physiol. Behav.* 1993; 44: 959-963.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploration behavior. *J.Comp.Psychol.Psychol.*1955; 48: 254-260

Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1): 1-28.

Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000; 14(1): 55-69.

Norton, GR; Trifunovic, B. & Woodiwiss, A.J. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *Eur J Appl Physiol.* 2000; 81(4): 310-316.

Oliveira M, Bessa JM, Mesquita A, Tavares H, Carvalho A, Silva R, Pego JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N. Induction of a hyperanxious state by antenatal dexamethasone: a case for less detrimental natural corticosteroids. *Biol Psychiatry.* 2006; 1, 59(9): 844-852.

Pagonis TA, Angelopoulos NV, Koukoulis GN, Hadjichristodoulou CS. Psychiatric side effects induced by supraphysiological doses of combinations of anabolic steroids correlate to the severity of abuse. *Eur Psychiatry.* 2005;12: 1-12.

Parra, L.F. Efeito da remoção das vibrissas mistaciais sobre o comportamento exploratório do rato no labirinto em cruz elevado sob condições de claridade e obscuridade. [Dissertação] Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. São Paulo, 1999.

Parssinen M, Seppala T. Steroid use and long-term health risks in former athletes. *Sports Med.* 2002; 32(2): 83-94.

Pellow, S, Chopin, P, File, SE, Briley, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. *J Neurosci Meth.* 1985; 14: 49 – 167.

Pereira LO, DA Cunha IC., Neto JM, Paschoalini MA, Faria MS. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res.* 2005; 159(1): 55-61.

Pertusi R, Dickerman RD, Mcconathy WJ. Evaluation of aminotransferase elevations in a bodybuilder using anabolic steroids: hepatitis or rhabdomyolysis. *J Am Osteopath Assoc.* 2001; 101(7): 391-394.

Picazo O, Fernandez-Guasti A. Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Res.* 1995; 680(1-2): 135-141.

Pinel JPJ & Treit D. Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1978; 92: 708-712.

Pinheiro, Gilson DE Assis, Alves, Sérgio Henrique DE Souza, Murce, Pedro Paulo *et al.* Involvement of 5-HT₂ receptors of the amygdala in anxiety levels induced by exposure of rats to the elevated plus-maze. *Psic Teor e Pesq.* 2002; 18, 3:329-335.

Pizzol TDA S, Branco MM, Carvalho RM, Pasqualotti A, Maciel EN, Migott AM. Non-medical use of psychoactive medicines among elementary and high school students in Southern Brazil. *Cad Saúde Publica.* 2006; 22(1): 109-115.

Poletti A, Negri-Cesi P, Melcangi RC, Colciago A, Martini L, Celotti F. Expression of androgen-activating enzymes in cultured cells of developing rat brain. *J Neurochem.* 1997; 68(3): 1298-1303.

Pope HG. JR. and Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry.* 1988; 145: 487-490.

Pratt, JA. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther.* 1992; 55(2): 149-81

Rabkin, JG; Wagner, GJ & Rabkin, R. A double-blind, placebo-controlled trial of testosterone therapy for HIV-positive men with hypogonadal symptoms. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57: 141-147.

Rang HP., DLE MM. & Ritter J. M. Pharmacology. *Person Professional Ltd.* 1995.

Rebouças RC, Schmidek WR. Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.* 1997 ;62(5):1159-1164.

Renard GM, Suarez MM, Levin GM, Rivarola MA.. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiol Behav.* 2005; 85(3): 363-369.

Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1): 107-111.

Rich JD, Dickinson BP, Feller A, Pugatch D, Mylonakis E. The infectious complications of anabolic-androgenic steroid injection. *Int J Sports Med.* 1999; 20(8): 563-566.

- Rodgers, RJ, Johnson NJT. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59: 221-232.
- Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spationtemporal ethological measures in the murine elevated plus maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1995; 52: 297-303.
- Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav.* 1999; 1-15; 68(1-2): 47-53.
- Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain.* 1991; 45(2): 211-6.
- Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; 22(9): 410-416.
- Ryan AJ. Anabolic steroids are fool's gold. *Fed Proc.* 1981; 40(12): 2682-2688.
- Saborido A, Molano F, Megias A. Effect of training and anabolic-androgenic steroids on drug metabolism in rat liver. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25(7): 815-822.
- Salvador A, Moya-Albiol L, Martinez-Sanchis S, Simon VM. Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice. *Percept Mot Skills.* 1999; 88(1): 319-328.
- Setem J, Silveira R, Morato S. Efeitos comportamentais e bioquímicos da restrição de água sobre o comportamento exploratório de ratos no Labirinto em Cruz Elevado, **XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambu, MG, Anais, 2000; 187.
- Siegel A., Roeling TA, Gregg TR and Kruk MR. Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999; 23: 359-389.
- Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte.* 2002; 8(6): 235-243.
- Simon F, Ly TD, Baillou-Beaufils A, Fauveau V, De Saint-Martin J, Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Saragosti S, Courouge AM, Ingrand D. Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. *AIDS.* 1994; 8(11): 1628-9.

- Sternbach H. Age-associated testosterone decline in men: clinical issues for psychiatry. *Am J Psychiatry*. 1998; 155(10): 1310-1318.
- Stein ST. Incompatibilities of preoperative medications. *Imprint*. 1973; 20(4): 21-22 passim.
- Stimac D, Milic S, Dintinjana RD, Kovac D, Ristic S. Androgenic/Anabolic steroid-induced toxic hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 35(4): 350-352.
- Tan RS, Philp PS. Perceptions of and risk factors for andropause. *Arch Androl*. 1999; 43(3): 227-233
- Thein LA, Thein JM, Landry GL. Ergogenic aids. *Phys Ther*. 1995; 75(5): 426-39.
- Thiblin, I.; Runeson, B. & Rajs, J. Anabolic androgenic steroids and suicide. Ann. *Clin Psychiatry*. 1999; 11(4): 223-231.
- Thrane PS, Maehlen J, Stoltenberg L, Brandtzaeg P. Retrograde axonal cytokine transport: a pathway for immunostimulation in the brain inducing hypoxia and sudden infant death. *Med Hypotheses*. 1995; 44(2): 81-84.
- Titlestad, SD; Lambert, MI & Schwellnus, MP. A survey to determine types and dosages of anabolic androgenic steroids used by competitive bodybuilders in South Africa. S. Afr. J. *Sports Med*. 1994; 1: 24-28.
- Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988; 31(4): 959-962.
- Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985; 9(2): 203-222.
- Treit, D; Menard, J. & Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993; 44: 463-469.
- Van Wayjen, RGA. Clinical-pharmacological basis of anabolic treatment. *Tijdschr Geneesk*. 1972; 28: 554-571.
- Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 49(3): 549-554.
- Weiss, SM; Wadsworth, G; Fletcher, A & Dourish, CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998; 23: 265-271.

Wilson, J D.;Griffin, JE; Russell, DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev. Bethesda*.1993; 14(5): 577-593.

Wilson JD. In: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics; 9th ed. Hardman, J.G. & Limbird, L.E. (Eds), McGraw-Hill, New York, USA: 1996; 1441-1457.

Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem*. 1997; 43(7): 1289-1292.

Yesalis, CE. Anabolic steroids in sport and exercise. *Champaign, IL, Human Kinetics*, 1993; 325.

Zangrossi H JR, File SE. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull*. 1992; 29(3-4): 381-388.

Zangrossi H JR, File SE. Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992; 43(4): 1195-1200.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **754-1**, sobre **"EFEITO DE ESTERÓIDE ANABÓLICO NANDROLONA SOBRE O NÍVEL DE ANSIEDADE EM RATOS"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes / Vanessa de Moraes Rocha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 02 de dezembro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **754-1**, entitled **"EFFECT OF ANABOLIC STEROID NANDROLONE ON THE ANXIETY LEVEL OF RATS"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 2nd, 2004.

Campinas, 02 de dezembro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP