

Universidade Federal Do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas de Saúde

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Efeitos da nandrolona e da ceftriaxona na homeostasia glutamatérgica: uma busca por mecanismos interativos entre astrócitos e neurônios envolvidos no comportamento agressivo.

Marcelo Salimen Rodolphi

Porto Alegre, fevereiro de 2017.

Efeitos da nandrolona e da ceftriaxona na homeostasia glutamatérgica: uma busca por mecanismos interativos entre astrócitos e neurônios envolvidos no comportamento agressivo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Básicas de Saúde-Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor C. Portela

Porto Alegre, fevereiro de 2017.

CIP - Catalogação na Publicação

Rodolphi, Marcelo Salimen

Efeitos da nandrolona e da ceftriaxona na homeostasia glutamatérgica: uma busca por mecanismos interativos entre neurônios e astrócitos envolvidos no comportamento agressivo / Marcelo Salimen Rodolphi. - 2017.

65 f.

Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Esteroides anabolizantes androgênicos. 2. Agressividade. 3. Sinapse glutamatérgica. 4. Ceftriaxona. 5. Mitocôndria. I. Portela, Luis Valmor Cruz, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao professor Luis Valmor Cruz Portela pela oportunidade concedida, pela confiança depositada, pelos ensinamentos diários tanto na ciência quanto na vida e por ser o meu mestre e exemplo na pesquisa científica.

Ao amigo Eduardo Zimmer pelo empurrão para a ciência, as primeiras dicas desse mundo novo e principalmente pelo exemplo e amizade diária acima de tudo.

Aos ex colegas e amigos Kamila Zenki e Eduardo Kalinine pela grande ajuda no início da minha caminhada na ciência.

Aos colegas do “Team Roska”, Clarissa, Gisele, Randhall, Afonso, Nathan, Mônia e Marcell pela paciência e ensinamentos científicos, pela grande ajuda nos experimentos e pelo companheirismo e amizade.

Às colegas de Laboratório 26, Amanda, Daniela G, Daniela M, Fernanda, Marcus e à professora Lisiane pelo companheirismo e ajuda nesta caminhada.

À colega Fernanda do laboratório 28 pela dosagem de amostras de líquido.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada.

Um agradecimento especial aos amigos da secretaria pela paciência e compreensão e pela ajuda.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Histórico dos esteroides anabolizantes androgênicos	7
1.2. Estrutura e classe dos esteroides anabólicos androgênicos	9
1.3. Mecanismo de ação dos EAA	11
1.4. Relação estrutura atividade dos EAA	13
1.5. Efeitos adversos dos EAA	15
1.6. Efeitos dos EAA no SNC e agressividade	16
1.7. Sistema glutamatérgico	18
1.8. Antibióticos β -lactâmicos	20
1.9. Efeitos da ceftriaxona no SNC	22
1.10. Mitocôndria	23

PARTE II

2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
2.2.1. Parâmetros comportamentais	27
2.2.2. Parâmetros neuroquímicos astrocitários	27
2.2.3. Parâmetros neuroquímicos neuronais	27
2.2.4. Atividade mitocondrial	27
3. METODOLOGIA	27
3.1. Animais e tratamento	27
3.2. Parâmetros comportamentais	29
3.2.1. Campo aberto	29
3.2.2. Teste do intruso/residente	29
3.3. Coleta de amostras	30
3.4. Avaliação neuroquímica	30

3.4.1.	Procedimento cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	30
3.4.2.	Immunoblotting	31
3.5.	Avaliação metabólica	32
3.5.1.	Respirometria	32
3.5.2.	Produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	33
3.5.3.	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	33
3.6.	Desenho experimental	33
3.7.	Análise dos resultados	34
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Parâmetros comportamentais	35
4.1.1.	Avaliação da atividade locomotora e exploratória	35
4.1.2.	Avaliação do comportamento agressivo	36
4.2.	Parâmetros neuroquímicos	36
4.2.1.	Níveis de glutamato no líquido	36
4.2.2.	Determinação do imunoconteúdo de GLT-1	37
4.2.3.	Determinação do imunoconteúdo da subunidade NR2B total e fosforilada (Ser1232) do receptor glutamatérgico NMDA	38
4.3.	Parâmetros mitocondriais	40
4.3.1.	Capacidade respiratória mitocondrial	40
4.3.2.	Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	41
4.3.3.	Potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)	42
 PARTE III		
5.	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÃO	49
7.	PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		51

PARTE I

RESUMO

Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) como o decanoato de nandrolona (ND) são hormônios sintéticos derivados da testosterona. Sabe-se que um dos efeitos mais marcantes da administração abusiva destes esteroides é o aumento do comportamento agressivo. Evidências indicam que altas doses de EAA alteram a morfologia e causam hiperativação de sinapses glutamatérgicas, o que se correlaciona com um fenótipo agressivo exacerbado. Fisiologicamente o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no cérebro de mamíferos, entretanto, em níveis elevados, pode causar hiperexcitabilidade neuronal mediada pelos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo *N-metil-d-aspartato* (NMDAr) e, conseqüentemente alterações no metabolismo mitocondrial. A terminação da sinalização excitatória glutamatérgica é realizada majoritariamente por transportadores existentes em astrócitos. Neste sentido, o transportador astrocitário de glutamato GLT-1 é responsável por mais de 90% da remoção do glutamato da fenda sináptica, contribuindo significativamente, para a manutenção da homeostasis da sinalização glutamatérgica. A administração do antibiótico β -lactâmico ceftriaxona (CEF) aumenta a expressão de GLT-1 e diminui a hiperexcitabilidade glutamatérgica, o que poderia potencialmente contrapor mecanismos cerebrais associados ao aumento do fenótipo agressivo induzidos pelo decanoato de nandrolona (ND). Entretanto, estas possíveis interações moleculares e comportamentais ainda não foram exploradas. Assim, o objetivo primário deste trabalho foi investigar se o aumento da expressão do transportador astrocitário GLT-1 modula mecanismos glutamatérgicos envolvidos na agressividade induzida pelo ND, e a atividade mitocondrial. Para tanto, camundongos CF-1 machos de 60 dias de idade foram divididos em 4 grupos: veículo oleoso (VEH), nandrolona (ND), ceftriaxona (CEF) e nandrolona+ceftriaxona (ND/CEF). A nandrolona foi injetada por via subcutânea (15mg/Kg) por 19 dias. A ceftriaxona (200mg/Kg) ou solução salina foram administradas intraperitonealmente por 5 dias. Após a última injeção foi avaliada a latência para o primeiro ataque e o número de ataques no teste do intruso. Os animais foram sacrificados logo após o teste, e homogeneizados de córtex foram utilizados para imunoquantificação do GLT-1 e da fosforilação da subunidade pNR2B^{ser1232} do NMDAr. A atividade mitocondrial foi avaliada em sinaptossoma de cérebro total. Os níveis de glutamato foram medidos no líquido cefalorraquidiano. Comparado com o veículo, o tratamento com ND diminuiu significativamente a expressão do GLT-1, aumentou os níveis de glutamato e a expressão da subunidade pNR2B^{ser1232} o que foi mecanisticamente associado ao aumento do fenótipo agressivo; diminuição da latência e aumento do número de ataques ao intruso. Ainda, a ND diminuiu o controle respiratório mitocondrial. A administração de CEF aumentou significativamente a expressão do GLT-1 e diminuiu os níveis de glutamato em relação ao grupo ND, enquanto que os níveis de pNR2B^{ser1232} e a agressividade foram similar ao grupo controle. No grupo ND/CEF o imunoconteúdo de GLT-1 e de pNR2B^{ser1232}, os níveis de glutamato e o fenótipo agressivo, foram significativamente menores que no grupo ND, e similares ao grupo controle. Ainda, a CEF foi capaz de atenuar o prejuízo no controle respiratório mitocondrial causado pela ND. Nossos resultados demonstram que a interação bidirecional entre o transportador astrocitário GLT-1 e a subunidade pNR2B^{ser1232} neuronal mediada pelo glutamato, exercem um impacto regulatório no fenótipo agressivo induzido pela ND, e no controle respiratório mitocondrial. Desta maneira, este

modelo reforça a importância da homeostasia funcional da sinapse tripartite glutamatérgica no fenótipo agressivo.

Palavras-chave: Esteroides anabolizantes androgênicos, Agressividade, Glutamato, Ceftriaxona, GLT-1, NMDAr, Mitocôndria.

ABSTRACT

Anabolic androgenic steroids (AAS) such as nandrolone decanoate (ND) are synthetic hormones derived from testosterone. It is known that one of the most important adverse effects of abusive administration of these steroids is the increase in aggressive behavior. Evidence indicates that high doses of AAS alter morphology and cause hyperactivation of glutamatergic synapses which correlates with an aggressive exacerbated phenotype. Physiologically, glutamate is considered the main excitatory neurotransmitter in the mammalian brain. At high glutamate levels, occurs neuronal hyperexcitability mainly through the ionotropic N-methyl-d-aspartate (NMDAr) type of glutamatergic receptors and, consequently, changes in mitochondrial metabolism. Existing transporters in astrocytes predominantly perform the termination of glutamatergic excitatory signaling. In this sense, the GLT-1 glutamate astrocytic transporter is responsible for more than 90% of glutamate removal from the synaptic cleft, contributing significantly to the maintenance of glutamatergic signaling homeostasis. Administration of the β -lactam antibiotic ceftriaxone (CEF) increases GLT-1 expression and decreases glutamatergic hyperexcitability, which could potentially counteract brain mechanisms associated to increased aggressive phenotype mediated by nandrolone decanoate (ND). However, a possible molecular and behavioral interaction has not yet been explored in context. Thus, the primary objective of this work was to investigate whether increased expression of the GLT-1 astrocyte transporter modulates the glutamatergic mechanisms involved in ND-induced aggressive phenotype, and mitochondrial activity. Sixty-day-old male CF-1 mice were divided into 4 groups: oil vehicle (VEH), nandrolone (ND), ceftriaxone (CEF) and nandrolone + ceftriaxone (ND / CEF). Nandrolone was injected subcutaneously (15mg / kg) for 19 days. Ceftriaxone (200mg / kg) or saline solution were administered intraperitoneally for 5 days. After the last injection, the latency for the first attack and the number of attacks on the intruder test were evaluated. The animals were sacrificed after the test, and homogenized cortex were used for immunoquantification of GLT-1 and phosphorylation of the NMDAr pNR2B^{ser1232} subunit. Mitochondrial activity was evaluated in total brain sinaptosomes. Glutamate levels were measured in the cerebrospinal fluid. Compared to the vehicle group, treatment with ND significantly decreased the expression of GLT-1, increased glutamate levels and expression of the pNR2B^{ser1232} which was mechanistically associated with an increase in the aggressive phenotype; decrease in the latency and increase in the number of attacks. Also, ND decreased mitochondrial respiratory control. Administration of CEF significantly increased GLT-1 expression and decreased glutamate levels relative to the ND group, whereas pNR2B^{ser1232} levels and aggressive phenotype were similar to the control group. In the ND / CEF group the expression of GLT-1 and pNR2B^{ser1232}, glutamate levels and aggressive phenotype were significantly lower than in the ND group, and similar to the control group. Furthermore, CEF was able to attenuate the alteration in the mitochondrial respiratory control caused by ND. Our results demonstrated that the levels of glutamate astrocytic transporter GLT-1 and pNR2B^{ser1232} are important mechanism behind the increased aggressive phenotype induced by ND, and decreased mitochondrial respiratory control. Also, this model reinforces the importance of glutamate levels and astrocytic molecular targets in the regulation of the aggressive phenotype.

Key words: Androgenic anabolic steroids, Glutamate, Ceftriaxone, GLT-1, NMDAr, Mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - 5-methyl-4-isoxazole propionate

CEF - Ceftriaxona

DHT - Diidrotestosterona

EAA – Esteroides anabolizantes androgênicos

GLAST – Transportador de glutamato e aspartato 1

GLT-1 – Transportador de glutamato 1

HDL – Lipoproteína de alta densidade

KA – Ácido caínico

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

ND – Decanoato de nandrolona

NMDA – N-metil-D-aspartato

OXPHOS – Fosforilação oxidativa

RA – Receptores androgênicos

RE – Receptores estrogênicos

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

T – Testosterona

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

VEH – Veículo

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 – Estrutura química da Testosterona.

Fig.2 – As três maiores classes de EAA.

Fig.3 – Diferentes vias metabólicas da Testosterona (T).

Fig.4 – Modificações estruturais nos anéis A e B da T que aumentam a atividade anabólica.

Fig.5 – Estrutura química de diferentes antibióticos β -lactâmicos.

Fig.6 – Representação esquemática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Fig.7 – Gráficos obtidos da análise no aparato campo aberto.

Fig.8 – Gráficos obtidos da análise do teste do intruso.

Fig.9 – Gráfico obtido da análise do conteúdo, em μM , de glutamato no líquido céfalo-raquidiano por HPLC.

Fig.10 – Gráficos obtidos através da determinação do imunoc conteúdo de GLT-1 por *Western Blot* em homogeneizado de córtex.

Fig.11 – Gráficos obtidos através da determinação do imunoc conteúdo de NMDAr por *Western Blot* em homogeneizado de córtex.

Fig.12 – Gráfico obtido através da determinação da razão entre os imunoc conteúdos de p-NR2B^{ser1232} e NR2B total obtidos por *Western Blot*.

Fig.13 – Gráficos obtidos da análise da respirometria de sinaptossomas em um respirômetro de alta resolução em tempo real.

Fig.14 – Gráficos obtidos da análise do teste de amplex red em sinaptossomas.

Fig.15 – Gráficos obtidos da análise do teste de safranina em sinaptossomas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico dos esteroides anabolizantes androgênicos

A descoberta de um processo para sintetizar o hormônio esteroide testosterona (T) a partir do colesterol em 1935 acelerou as investigações científicas em relação aos seus efeitos androgênicos. A T, rapidamente ganhou notoriedade por suas propriedades anabólicas de aumento de tamanho muscular e força; e por suas propriedades androgênicas de aumento de virilização e agressividade (Kicman & Gower, 2003).

Na década de 50 surgem as primeiras suspeitas de que a T estava sendo usada para aumento de performance esportiva com a alegação de que atletas soviéticos administravam T para aumento de força (Todd, 1987). Devido ao grande impacto político dos esportes de competição e a necessidade de demonstrar a hegemonia de um sistema sobre outro, médicos e químicos nos Estados Unidos uniram-se para produzir um esteroide anabólico que melhorasse o desempenho dos atletas americanos. Como resultado surgiu o anabólico esteroide chamado de dianabol (Kruskemper, 1968).

Enquanto isso, algumas companhias farmacêuticas desenvolviam análogos sintéticos da T com objetivos terapêuticos, como tratar pacientes acometidos de ‘doenças catabólicas’, melhorar os efeitos anabólicos da T e dissociar os efeitos androgênicos indesejados, particularmente diminuir os efeitos virilizantes. O decanoato de nandrolona (ND) foi o primeiro análogo sintético da T a mostrar suficiente dissociação entre efeitos anabólicos e androgênicos, favorecendo os efeitos androgênicos (Hershberger, Shipley, & Meyer, 1953) que justificassem sua introdução como fármaco em humanos (Kruskemper, 1968).

No início dos anos 60, os esteroides anabólicos ganham notoriedade mundial principalmente pelo aumento da massa muscular entre atletas fisiculturistas (Du Toit, Rossouw, Van Rooyen & Lochner, 2005). Com a crescente disponibilidade destes compostos licenciados oficialmente pelos governos para uso terapêutico, muitos competidores começaram a experimentá-los cada vez mais numa tentativa de melhorar sua performance esportiva sem demonstrar os efeitos androgênicos característicos do uso da T (Kicman & Gower, 2003).

Na década de 60 houveram relatos de aumento no número de mortes entre atletas pelo uso de estimulantes e, como resultado, em 1967 o Comitê Olímpico

Internacional (COI) cria uma comissão médica que bane a prática do doping no esporte. Entretanto, entre as substâncias proibidas não estavam os esteroides anabólicos pois, no momento, não existiam procedimentos analíticos capazes de quantificar estas substâncias em amostras biológicas de maneira sensível e rápida (Kicman & Gower, 2003). Em 1969, a primeira técnica para a dosagem de esteroides em fluidos biológicos foi publicada (Kicman & Brooks, 1988). Embora esta técnica atingisse alguns dos critérios necessários para ser implementada nos controles antidopagem, ela ainda não conseguia identificar diferentes tipos de EAA na mesma amostra biológica (Kicman & Gower, 2003). Nas olimpíadas de Munique, em 1972, uma grande quantidade de atletas do atletismo admitiram fazer uso de substâncias como os esteroides anabolizantes para a melhora de performance (Loughton & Ruhling, 1977). Na segunda metade da década de 70 foram desenvolvidas técnicas de radioimunoensaio para detectar a presença de ND e seus metabólitos na urina (Kicman & Brooks, 1988). Estas técnicas proporcionaram um grande avanço no controle de dopagem e subsídios técnicos para a criação de novas legislações.

A partir de 1975, véspera dos jogos olímpicos de Montreal, o COI estabelece a proibição do uso de esteroides anabolizantes e o controle do seu uso por atletas que, a partir disto, passam a ser submetidos à análises bioquímicas regulares previamente e durante as competições, principalmente em amostras de urinas (Kochakian, 2000). No início dos anos 80, rápidos avanços na espectrometria de massa permitiram aos laboratórios do COI desenvolverem métodos específicos e abrangentes capazes de detectar concentrações de esteroides anabólicos e/ou seus metabólitos em concentrações tão pequenas quanto $1\mu\text{g/L}$ na urina (Catlin et al., 1987).

Mesmo com um controle rigoroso por parte do COI em relação ao uso de substâncias proibidas, muitos casos de doping ocorreram entre os jogos olímpicos de Los Angeles e Atlanta ocorridos em 1984 e 1996 respectivamente. Casos enigmáticos como o do velocista Ben Johnson permanecem na lembrança de todos. Após bater o recorde mundial na prova dos 100 metros livres em Seul, 1988, foi detectada a presença de stanazolol em sua urina e, como consequência, ele perde seu título olímpico (Calfee & Fadale, 2006).

Com o objetivo de melhorar controle de doping no esporte, principalmente em jogos olímpicos, a Agência Mundial Antidoping (AMA) estabeleceu uma lista de substâncias proibidas para uso por atletas e métodos analíticos específicos para serem utilizados na detecção destas substâncias. Estes parâmetros passaram a ser adotados

como padrão de controle de doping a partir dos jogos olímpicos de Sidnei em 2000 (Wada, 2003).

Nos últimos anos, o abuso de drogas como os esteroides anabolizantes tem se tornado muito comum em esportistas recreacionais e jovens em idade escolar que utilizam os EAA principalmente como o objetivo de melhorar a imagem estética (Dal Pizzol et al., 2006; Wood, 2006). Portanto, o uso de esteroides anabolizantes não é mais exclusivo de atletas de elite.

1.2 Estrutura e classes dos esteroides anabolizantes androgênicos

Esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da T utilizados para melhora da capacidade física e no tratamento de diversas doenças (Busardo et al., 2015). A T é um hormônio composto por 19 átomos de carbono, conforme a **Figura 1** e, quimicamente, serve como base para todos os esteroides anabolizantes.

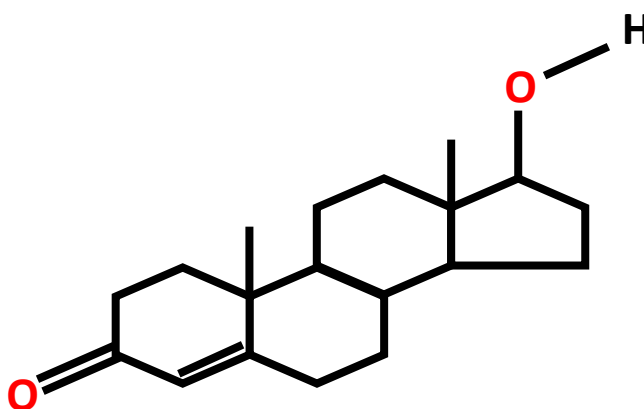


Fig. 1– Estrutura química da Testosterona

Existem três principais classes de EAA conforme a **Figura 2** (Oberlander & Henderson, 2012).

Integram a classe I compostos injetáveis contendo ésteres de cadeia longa do grupo 17-β-hidroxil. Esta esterificação confere um maior tempo de liberação na circulação uma vez que retarda a degradação destes compostos e prolonga o tempo de

ação. Como exemplo estão o propionato e cipionato de T (Shahidi, 2001). Os ésteres de T podem sofrer hidrólise pela ação da 5- α -redutase, formando um metabólito com maior atividade anabólica devido à sua maior afinidade pelos receptores androgênicos (RA), a 5- α -dihidrotestosterona. A T também pode sofrer a ação da aromatase formando estrógenos (Martini, 1982).

A classe II abrange, também, compostos injetáveis derivados da 19-nortestosterona. Possuem diferenças estruturais em relação aos ésteres de T pela adição de uma longa cadeia carbonada em C17, o que confere à molécula uma redução na atividade androgênica em relação diidrotestosterona devido a uma redução da afinidade ao RA. Além disso, ocorre a substituição de um hidrogênio por uma metila em C19, o que aumenta a meia vida destes compostos e contribui para a esterificação. A exemplo dos ésteres de T da classe I, O DN também pode ser aromatizado à 17- β -estradiol, embora este processo não seja tão eficiente quanto é em relação à T (Shahidi, 2001). A ação dos EAA aromatizáveis das classes I e II no SNC ocorre pela interação farmacológica direta com os RA e, também, através dos metabólitos ativos (estrógenos) que ligam-se aos receptores estrogênicos (RE) no cérebro (Wilson, 1988).

A classe III é composta pelos EAA de administração oral, que por possuírem uma alquilação no C17 apresentam um metabolismo hepático retardado, possibilitando a administração oral destes compostos. Os esteroides 17- α -alquilados não são convertidos a diidrotestosterona ou 17- β -estradiol, mas podem dar origem a outros metabólitos andrógenos e estrógenos ativos. Nesta classe estão a metiltestosterona, oximetolona, metandrostenelona estanozolol (Winters, 1990; Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001).

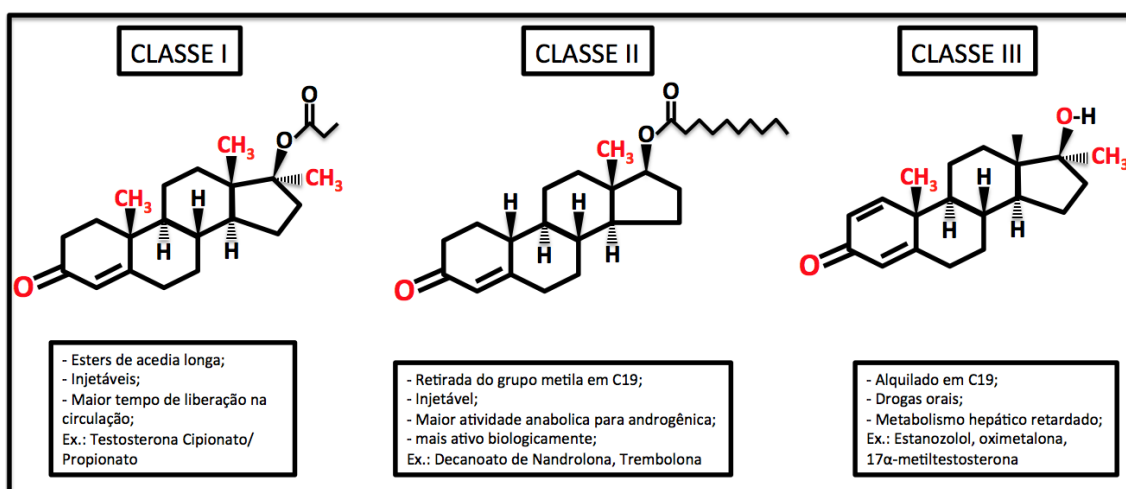


Fig. 2 – As três maiores classes de EAA.

1.3 Mecanismo de ação dos EAA

Na grande maioria das células alvo, A T exerce sua ação após a ação da enzima 5- α -reductase, que converte localmente a T em diidrotestosterona (DHT), um metabólito ativo. A T e DHT possuem afinidade pelo RA e ligam-se a eles. A T também pode ser convertida à estradiol, outro metabólito da T hormonalmente ativo, pela ação da aromatase. O estradiol liga-se ao RE conforme a **Figura 3** (Busardo et al., 2015). (Buchner, 1999).

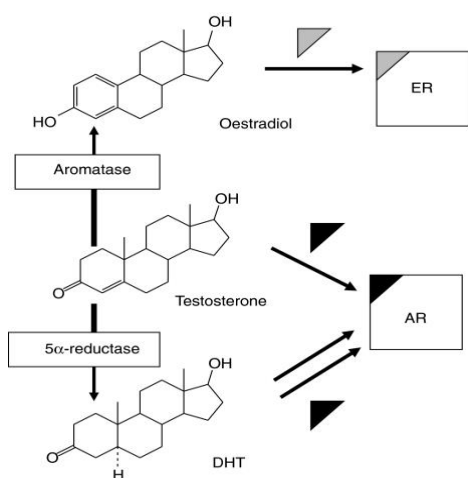


Fig. 3 – Diferentes vias metabólicas da Testosterona (T)

DHT – Diidrotestosterona (DHT)

ER – Receptores estrógenos (RE)

AR – Receptores andrógenos (RA)

Figura adaptada de Kicman, 2008

Por seu caráter lipofílico, a T e os EAA, dentre outros esteroides, atravessam as membranas fisiológicas com facilidade. No ambiente intracelular há formação do complexo hormônio-receptor, através de uma ligação específica, que depende das características químicas de cada esteroide (Kicman, 2008).

A ação dos andrógenos pode ocorrer diretamente em receptores específicos, sendo que, quando disponíveis na circulação, seu transporte ocorre através da corrente sanguínea como mensageiros, na forma livre ou combinada às moléculas responsáveis pelo transporte. Quando na sua forma livre, sua difusão através da membrana plasmática de células alvo se dá de forma direta, possibilitando sua ligação à receptores proteicos intracelulares, num processo que, por si só, acarreta em uma maior produção de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) e conseqüentemente, aumentando o metabolismo celular (Celotti & Negri Cesi, 1992). No interior da célula (citoplasma) ocorre a migração da molécula de esteroide, ligada ao seu RA específico, para o núcleo, onde dará início ao processo de transcrição gênica e de transdução proteica, responsável pela modulação das ações celulares dependentes dos andrógenos (Celotti & Negri Cesi, 1992; Shahidi, 2001). Os diversos órgãos respondem de maneira diferente à essas ações

dos andrógenos uma vez que variam as concentrações de receptores celulares, bem com da atividade da enzima 5- α -redutase na produção de DHT (Kuhn, 2002). A 5- α -redutase aparece em praticamente todas as estruturas androgênio-dependentes de indivíduos do sexo masculino, por outro lado, a enzima aromatase vem sendo demonstrada e caracterizada principalmente em cérebro e tecido adiposo (Martini, 1982). No coração e na musculatura esquelética a atividade aromatase aparenta ser muito baixa (Matsumine et al., 1986). Quando comparada a outros tecidos que possuem uma dependência dos andrógenos, a musculatura se caracteriza por uma baixa ou até mesmo ausência do processo de 5- α -redução o que se explica, segundo alguns autores (Bartsch, Krieg, & Voigt, 1980), pela quase total ausência desta enzima na musculatura esquelética. Somado à isso foi demonstrado, anteriormente, *in vitro*, que na musculatura esquelética de ratos há uma quase total ausência desta enzima (Martini, 1982).

Existem duas vias pelas quais esteroides exercem suas ações. Na primeira, denominada “via clássica” os andrógenos ligam-se aos seus RA citoplasmáticos, ligação que é acompanhada da interação dos complexos resultantes com sítios nucleares e subsequentes efeitos genômicos como transcrição de genes (elaboração de RNA a partir de DNA e síntese de proteínas) ou repressão de genes (inibição da transcrição). Na segunda, denominada “via rápida” o efeito dos hormônios esteroides decorre basicamente de alterações na fluidez da membrana plasmática que podem ocorrer por três mecanismos diferentes: através da ligação aos RA e RE; através da ligação a receptores que não sejam os RA e RE e ainda; efeitos gerados independente da ligação aos receptores. Nesta via ocorrem alterações em vias de sinalização que envolvem proteínas como a adenilato ciclase, proteína cinase ativada por mitógeno e fosfatidilinositol-3-cinase (Falkenstein et al., 2000; Kicman, 2008).

Os receptores presentes na musculatura esquelética e cardíaca possuem a mesma afinidade e características bioquímicas do que aqueles existentes em órgãos reprodutores (Celotti & Negri Cesi, 1992). Porém, o número de receptores presentes nos músculos é muito menor do que os encontrados nos órgãos reprodutivos. No entanto, a quantidade de receptores também pode variar de acordo com o tipo de músculo (Janssen et al., 1994).

Ao ligarem-se aos RA, uma ação esperada dos EAA é a promoção de efeitos tróficos advindos especificamente dessa ligação levando a um aumento na síntese proteica e diminuição na degradação de proteínas (Celotti & Negri Cesi, 1992). Entretanto, como discutido anteriormente, os efeitos destas substâncias induzidos por

sua ligação aos RA variam conforme a concentração dos receptores no músculo alvo, que pode diferir muito de músculo para músculo (Janssen et al., 1994). Uma outra maneira pela qual os EAA podem induzir hipertrofia muscular esquelética ocorre pela sua habilidade de gerar ativação de células satélites e aumento no diâmetro de fibras musculares (Joubert & Tobin, 1989).

1.4 Relação estrutura atividade dos EAA

Os EAA sintéticos são considerados análogos químicos da T ou da DHT, sendo suas estruturas químicas desenhadas para aumentarem o efeito anabólico relativos aos efeitos androgênicos (Kicman & Gower, 2003). No entanto, uma dissociação completa dos efeitos anabólicos dos efeitos androgênicos não é possível, uma vez que muitas evidências sugerem que há apenas um tipo de receptor androgênico envolvido na regulação destes efeitos (Mooradian, Morley, & Korenman, 1987). Um mecanismo que poderia estar envolvido na dissociação parcial desses efeitos diz respeito à diferença da atividade da enzima 5- α -redutase em diferentes tecidos. Sabe-se que, por exemplo, ela possui mais atividade no tecido androgênico, levando a maiores efeitos androgênicos, o contrário do que ocorre no músculo esquelético, onde a atividade é irrisória, resultando em maiores efeitos anabólicos (Celotti & Negri Cesi, 1992). Uma forma de aumentar a dissociação anabólica androgênica é administrar um EAA que se ligue com alta afinidade ao RA, mas, ao ser reduzido a metabólitos 5- α , liga-se com menor afinidade ao RA (ND, por exemplo) (Toth & Zakar, 1982). Consequentemente, no tecido androgênico, o ND é prontamente convertida a um metabólito menos ativo, enquanto a molécula não modificada exercerá atividade predominantemente no músculo esquelético (Kicman & Gower, 2003).

O aumento na potência anabólica e a dissociação dos efeitos anabólicos dos androgênicos resulta geralmente de modificações no anel A da T e da DHT conforme **Figura 4** (adaptada de Kicman & Gower, 2003).

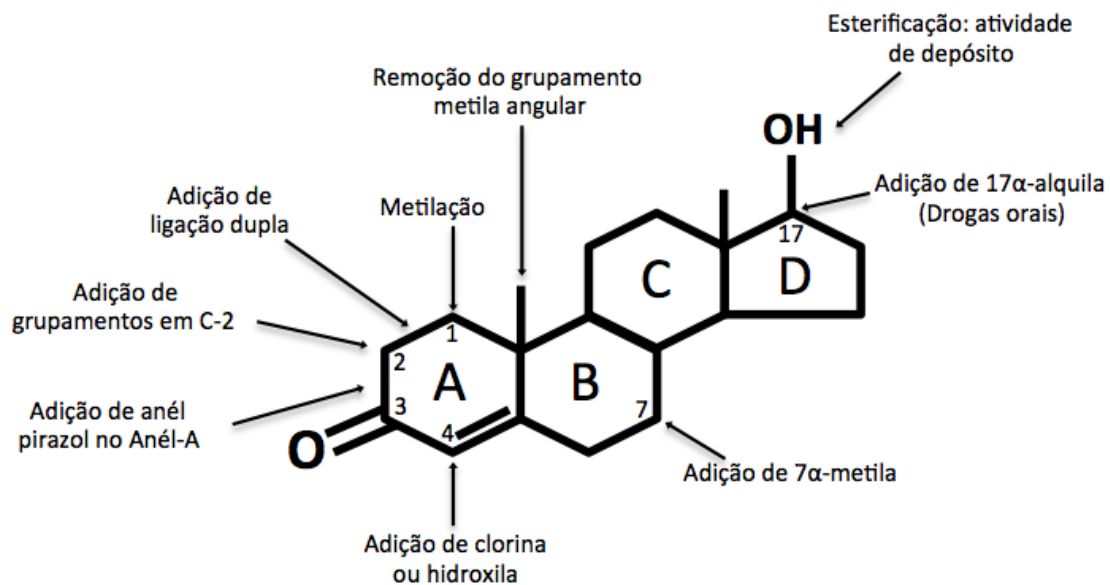


Fig. 4 – Modificações estruturais nos anéis A e B da T que aumentam a atividade anabólica.

A atividade anabólica destes compostos também pode ser conseguida pela administração por via oral. Neste caso, uma ligação de um grupo metil (CH_3) ou etil (C_2H_5) ao carbono 17 da molécula de T retarda a sua metabolização hepática tornando estes compostos oralmente mais ativos e mais resistentes às transformações decorrentes do metabolismo. Embora este processo preserve as propriedades ativas dos esteroides, ele traz como desvantagem uma grande sobrecarga ao fígado. Atividade oral também pode ser conferida pela ligação de um grupo metil ao carbono 1 (Shahidi, 2001; van der Vies, 1993).

A esterificação do grupo 17-hidroxil confere aos EAA injetáveis uma menor solubilidade, além disso, a duração da ação anabólica destes compostos irá depender do tipo de ácido usado para acidificar este grupo 17-hidroxil. Quando ocorre a substituição de um hidrogênio por um grupo metila em C19 há a formação do composto 19-nortestosterona (nandrolona), adicionado a isso, a esterificação do grupo 17-hidroxil da nandrolona com o ácido decanoico, um ácido graxo de cadeia longa, gera o composto denominado ND, que possui uma liberação lenta na circulação exercendo sua atividade anabólica após 6 a 7 dias (Shahidi, 2001). Para fins de utilização a quase totalidade destes compostos é dissolvida em veículo oleoso, olho de milho, por exemplo, e por não passarem pelo processo de alquilação inerente aos EAA de administração oral são

considerados menos nocivos do que esta classe de EAA. Em compensação os EAA injetáveis causam mais danos aos rins (Kam & Yarrow, 2005).

Ainda há poucos estudos sobre a atividade androgênica dos esteroides endógenos, entretanto tem se hipotetizado que ela deve ocorrer através da conversão desses esteroides endógenos em T e seu metabólito ativo DHT e sua ligação aos RA. Porém, há evidências mostrando que o androstenediol pode ativar alguns genes alvo regulados pelo RA mesmo em tecidos onde ocorre uma alta expressão destes receptores (Miyamoto et al., 1998).

1.5 Efeitos adversos dos EAA

A severidade dos efeitos adversos decorrentes do uso de EAA é dependente do gênero, idade, tipo de esteroide utilizado ou combinação de esteroides, dose, frequência de uso e interações medicamentosas (Bahrke & Yesalis, 2004; Kicman & Gower, 2003).

O uso abusivo pode causar dano irreversível em diversos órgãos, entretanto, mesmo em doses clínicas, os EAA apresentam efeitos adversos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e doenças cardiovasculares (Shahidi, 2001).

Um dos órgãos mais comumente afetados pelo uso indiscriminado dos EAA é o sistema reprodutor. Os efeitos em homens variam muito podendo ocorrer diminuição de níveis hormonais, afetando o hormônio luteinizante e folículo estimulante que, conseqüentemente podem levar à baixos níveis de produção de T endógena e da espermatogênese, além de atrofia testicular, que podem levar à infertilidade. Outro efeito recorrente em homens usuários de EAA é a ginecomastia, aparecimento de mamas, que pode resultar da conversão de andrógenos para estradiol e estrona (Maravelias et al., 2005; Wagner, 1991).

Os principais efeitos adversos observados em mulheres usuárias de EAA implicam em anormalidades no ciclo menstrual e, principalmente, efeitos masculinizantes, incluindo acne, engrossamento da voz, hipertrofia de clitóris e queda de cabelo. Em certos casos, dependendo do regime e tempo de uso, alguns destes efeitos androgênicos podem ser irreversíveis (Cohen & Hickman, 1987). Particularmente em crianças e jovens, o uso de EAA pode levar a um fechamento prematuro das epífises, conseqüentemente levando a antecipação do final da fase de crescimento, com redução do tamanho corporal definitivo (Maravelias et al., 2005).

O risco de efeitos adversos é maior em competidores que fazem uso de doses muito maiores do que a dose terapêutica de um ou mais desses EAA durante um longo período de tempo (Kicman & Gower, 2003). O Uso de EAA com acompanhamento médico pode trazer algum benefício clínico à pacientes. Alguns estudos relatam que um tratamento acompanhado e controlado com andrógenos apresenta reduções significativas nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) somado à aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Glazer, 1991). Em seu estudo, BONETTI et al., (2008) verificaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de glicose, insulina, globulina de ligação a hormônio sexual, HDL e, concomitantemente, alterações nos níveis de linfócitos T (glóbulos brancos), diminuição na contagem de espermatozoides com conseqüente diminuição do índice de fertilidade em fisiculturistas que faziam autoadministração de diversas combinações de classes EAA em doses supra fisiológicas com único intuito de ganho de massa muscular.

Alterações no SNC também são estudadas e relatadas e como conseqüências geram importantes alterações morfológicas e, principalmente, comportamentais que podem afetar negativamente a vida de usuários e familiares (Lukas, 1993; Snyder, 1984).

1.6 Efeitos dos EAA no SNC e agressividade

Mudanças comportamentais são efeitos recorrentes aos quais usuários de EAA estão sujeitos. Dentre as alterações mais frequentes encontram-se irritabilidade, agressividade, euforia, depressão, alterações do humor, entre outros. Um estudo de TAKAHASHI, TATSUGI e KOHNO (2004) demonstrou que a administração de doses supra fisiológicas de EAA em ratos foi responsável por um aumento do comportamento agressivo destes animais, sugerindo um possível efeito do uso de EAA no SNC relacionado à manifestação de comportamentos anormais.

Sabe-se que o comportamento masculino é influenciado de forma positiva e/ou negativa por fatores psíquicos, somáticos, sociais, culturais e também por influência do meio, entretanto os andrógenos desempenham um papel crucial neste comportamento masculino. Já foi demonstrado em diversos estudos que o uso de EAA em altas doses pode trazer efeitos negativos ao SNC de humanos, causando prejuízos a nível de alterações morfológicas, neuroquímicas e comportamentais. Relatos de aumento de

agressividade, transtornos de humor que vão da euforia à depressão, alterações na libido e, em alguns casos mais graves, surtos psicóticos derivados do aparecimento de alucinações, são muito comuns em usuários de EAA (Parrott, Choi, & Davies, 1994; Su et al., 1993). Embora o uso de EAA em humanos esteja fortemente relacionado com o aparecimento de um comportamento agressivo e, por vezes, violento, cabe ressaltar que a agressividade é uma resposta biológica natural, intrínseca no gênero masculino, que é manifestada em situação de imposição de um homem frente a outro ou outros na busca da satisfação das necessidades básicas tais como comida e água, abrigo e território. Nos mamíferos, o aparecimento de comportamento agressivo ou violento são evidenciados quando há a necessidade de defesa de território e acesso às fêmeas ou disputa pelas mesmas. Violência, por outro lado, é uma inapropriada, inadequada ou exagerada expressão da agressividade e pode estar associada à problemas psicológicos mais graves (McGinnis, 2004).

Andrógenos naturais ou seus análogos sintéticos podem potencializar o desempenho físico através do aumento na agressividade impulsividade, atributos comportamentais que são frequentemente explorados principalmente em competições que envolvem lutas e esportes com contato corporal, onde há o benefício da sobreposição física sobre os oponentes (Kicman & Gower, 2003). Entretanto, para alguns indivíduos, as mudanças psicológicas podem ser insidiosas, dando origem a comportamentos violentos e psicose (Pope & Katz, 1988, 1990). Por exemplo, o uso indevido de esteroides tem sido associado a assassinatos, tentativas de homicídios e violência contra mulheres (Choi & Pope, 1994; Pope & Katz, 1990).

Os andrógenos, comprovadamente, são potentes moduladores do comportamento agressivo (Busardo et al., 2015). Porém, quando se pretende analisar o efeito do uso de EAA no comportamento agressivo, em modelos experimentais com roedores, deve-se considerar diversas variáveis, como a classe dos EAA utilizados, a combinação ou não de classes de EAA, a dose utilizada, o tempo de tratamento, a idade dos animais, o gênero dos animais e a metodologia empregada no estudo, uma vez que estes fatores podem variar muito entre os estudos gerando resultados contraditórios (Henderson et al., 2006; McGinnis, 2004). A grande maioria dos estudos envolvendo os efeitos do uso de EAA no comportamento agressivo ainda utilizam roedores machos como sujeitos da pesquisa (Clark & Henderson, 2003).

Alguns estudos recentes sugerem que os EAA podem ter efeitos nas sinapses glutamatérgicas no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral, podendo ser responsáveis

por alterações morfológica e neuroquímicas que podem acarretar em mudanças comportamentais (Le Greves et al., 1997; Rossbach et al., 2007). O sistema glutamatérgico é o principal mecanismo de neurotransmissão excitatória do SNC de mamíferos. Ele está envolvido em processos de memória e aprendizado, proliferação e sobrevivência celular. Quando liberado na fenda sináptica, o glutamato liga-se tanto a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) quanto a receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G), resultando em ativação e/ou modulação do neurônio pós-sináptico. O glutamato não é metabolizado no ambiente extracelular, sua remoção da fenda sináptica é feita por transportadores específicos, principalmente astrocitários, que protegem os neurônios da excitotoxicidade decorrente dos elevados níveis de glutamato na fenda sináptica (Danbolt, 2001). A hiperexcitabilidade glutamatérgica gera um aumento no influxo de Ca^{2+} para dentro da célula o que pode causar alterações mitocondriais que podem acarretar em prejuízo da atividade neuroenergética e morte de neurônios. De todos os transportadores de glutamato clonados em mamíferos, o GLAST e o GLT-1 são predominantemente astrocitários. Dentre estes, o GLT-1 é considerado o principal responsável pela manutenção do tônus glutamatérgico fisiológico, evitando assim, a neurotoxicidade e morte neuronal (Anderson & Swanson, 2000).

1.7 Sistema Glutamatérgico

O aminoácido glutamato é o principal e o mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, tendo importante participação nos processos de comunicação intercelular, crescimento e diferenciação (Martinez-Lozada & Ortega, 2015). Entretanto, em elevadas concentrações extracelulares ele se torna neurotóxico podendo degenerar neurônios alvo (Miladinovic, Nashed, & Singh, 2015). A atividade neurotransmissora associada à sinalização glutamatérgica necessita da participação orquestrada da maquinaria presente nos neurônios e células da glia. Este arranjo morfológico e funcional tem sido definido nos últimos anos como sinapse tripartite (Martinez-Lozada & Ortega, 2015).

Quando liberado na fenda sináptica, o glutamato liga-se tanto a receptores ionotrópicos quanto a receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G) resultando em ativação e/ou modulação do neurônio pós-sináptico. Existem três principais classes de receptores ionotrópicos que são definidas pela farmacologia do seu sítio de ligação do

glutamato: 5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA), ácido caínico (KA) e N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Hollmann & Heinemann, 1994).

Enquanto os receptores AMPA e KA estão envolvidos primariamente na despolarização dependente de glutamato na sinapse excitatória, o receptor NMDA desempenha um papel especial permitindo a abertura de canais iônicos bem como o influxo de cálcio para o interior da célula apenas quando a presença de glutamato na fenda sináptica coincide com a despolarização da membrana pós-sináptica. Sendo assim, os receptores NMDA desempenham um papel crucial no aprendizado, memória e funções cognitivas em geral (Martinez-Lozada & Ortega, 2015).

O receptor NMDA é um composto heteromultimérico composto por uma combinação de subunidades: subunidade 1 (NR1), subunidade 2 (NR2A-D) e subunidade 3 (NR3A-B), sendo que para ser funcional ele deve conter pelo menos uma subunidade NR1, a qual apresenta o sítio de ligação específico do co-agonista glicina do NMDAr (Martinez-Lozada & Ortega, 2015). A subunidade 2 é composta por quatro subunidades: NR2A, NR2B, NR2C e NR2D e apresentam o sítio de ligação específico para o agonista glutamato do NMDAr. A subunidade 3 é composta por duas subunidades: NR3A e NR3B e apresentam sítio de ligação específico do co-agonista glicina do NMDAr (Martinez-Lozada & Ortega, 2015). Recentemente, o Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacologia (NC-IUPHAR) propôs alteração da nomenclatura das subunidades do receptor NMDA, substituindo o prefixo NR pelo prefixo GluN. Desta maneira, o NR1 passou a ser denominado de GluN1, e o NR2A passou a ser denominado GluN2A, o NR2B como GluN2B, e assim consecutivamente (ver revisão de Collingridge et al., 2009). Embora esta mudança de nomenclatura não seja recente, ainda é possível encontrar na literatura científica atual os dois tipos de denominação. Neste trabalho, ainda utilizamos a nomenclatura anterior a 2009.

O glutamato não é metabolizado no ambiente extracelular, sua remoção da fenda sináptica é feita por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT: *excitatory aminoacid transporter*), principalmente astrocitários, que protegem os neurônios da excitotoxicidade decorrente dos altos níveis de glutamato na fenda sináptica (Danbolt, 2001). Até o momento, 5 subtipos destes transportadores foram clonados: EAAT1 ou GLAST (transportador de glutamato aspartato 1); EAAT2 ou GLT-1 (transportador de glutamato 1); EAAT3 ou EAAC1 (carreador de aminoácidos excitatório 1); EAAT4 e EAAT5 (Danbolt, 2001). GLAST é principalmente encontrado

em astrócitos e oligodendrócitos, GLT-1 é encontrado em astrócitos ao longo do SNC, EAAT3 é encontrado principalmente em neurônios no hipocampo, gânglios basais e cerebelo; EAAT4 é encontrado em células de Purkinje e EAAT5 em fotorreceptores e células bipolares. Recentemente identificou-se uma classe de transportadores glutamatérgicos responsáveis pelo acúmulo de glutamato em vesículas pré-sinápticas: VGLUT1-3 (Arriza et al., 1997; Bar-Peled et al., 1997; Maragakis & Rothstein, 2004).

O astrócito, uma célula da glia especializada em diversas funções tanto regulatórias quanto de suporte, é o responsável pela remoção do excesso de glutamato na fenda sináptica em condições fisiológicas, prevenindo, assim, a excitotoxicidade glutamatérgica (Martinez-Lozada & Ortega, 2015). O GLT-1, é responsável por aproximadamente 90% de todo o transporte de glutamato no tecido cerebral adulto, enquanto o GLAST transporta em torno de 10 a 20 % (Rothstein et al., 1994). Ambos medeiam o transporte para o astrócito por meio do co-transporte de três íons Na⁺ e um íon H⁺, somado à saída de um íon K⁺. Portanto, o transporte de glutamato depende do gradiente de sódio proveniente da enzima Na⁺/K⁺ - ATPase, tornando assim, a captação de glutamato um processo energeticamente dispendioso (Danbolt, 2001).

Estudos com animais “*knockout*” corroboram a importância da recaptação astroglial do glutamato. A perda de função ou a expressão reduzida de GLAST ou GLT-1 causa o aumento das concentrações extracelulares de glutamato e neurodegeneração característica de excitotoxicidade (Rothstein et al., 1996); (Maragakis & Rothstein, 2004).

Uma vez removido da fenda sináptica, o glutamato é rapidamente convertido a glutamina pela ação da glutamina sintetase (Shank & Campbell, 1984; Tang et al., 2001). As SNATs (*Sodium-dependent neutral amino acid transporters*) são responsáveis tanto pela liberação glial de glutamina quanto pela captação da mesma pelos neurônios, onde é desaminada para regenerar glutamato que é carregado para as vesículas sinápticas devido à ação dos transportadores vesiculares (VGLUT) (Martinez-Lozada & Ortega, 2015).

1.8 Antibióticos β -lactâmicos

Na medicina, existe uma classe de medicamentos denominada de agentes antimicrobianos, responsáveis pelo tratamento de todo tipo de infecções que pode

acometer os seres vivos. Dentro destes agentes antimicrobianos, o grupo das cefalosporinas ganha destaque pela sua eficácia no tratamento de infecções causadas pela maioria dos cocos Gram-positivos e Gram-negativos (Saleh et al., 2009).

As cefalosporinas foram introduzidas na década de 60, quando as penicilinas não estavam mais sendo efetivas contra estafilococos. São classificadas em cefalosporinas de 1º, 2º, 3º e 4º geração. Atualmente o grupo mais abrangente das cefalosporinas é o das de 3º geração, devidos às suas características farmacocinéticas e ao seu ampliado espectro de ação (Lopes, Moreno, & Curi, 1990). Elas são agentes antimicrobianos β -lactâmicos clássicos que, em sua estrutura química, assemelha-se à das Penicilinas. Na prática clínica são utilizadas para o tratamento de uma gama de infecções como faringites, otites, infecções urinárias, septicemia e diversas outras (Freitas, 2014).

Os β -lactâmicos compartilham, em sua estrutura química, o anel nuclear e a atividade farmacológica β -lactâmica. No caso das penicilinas, o núcleo β -lactâmico está preso a um anel de tiazolidina com uma cadeia lateral R1 (Romano et al., 2000). A cadeia lateral contribui para suas propriedades farmacológicas, antibacterianas e imunológicas (Romano et al., 2004). As cefalosporinas são β -lactâmicos que contêm um anel diidrotiazona no lugar do anel de tiazolidina com duas cadeias laterais diferentes, R1 e R2 (Romano et al., 2000). A **figura 5** (Romano et al., 2000) mostra a estrutura química destes β -lactâmicos.

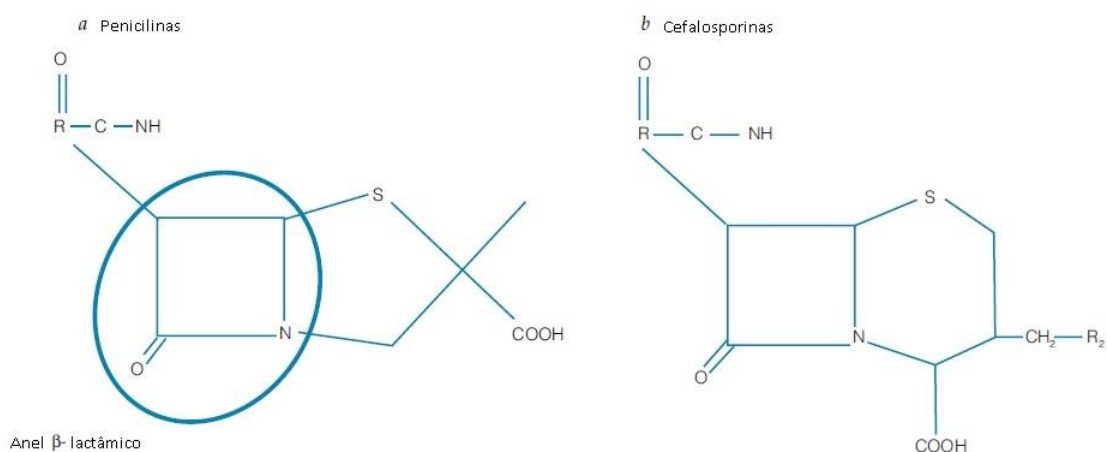


Fig. 5 - Estrutura química de diferentes antibióticos β -lactâmicos: (a) penicilinas; (b) cefalosporinas.

A Ceftriaxona sódica, um agente antimicrobiano β -lactâmico de uso parenteral que faz parte do grupo de cefalosporinas de terceira geração, vem ganhando destaque no mercado brasileiro, principalmente quando falamos do ambiente hospitalar, ela é muito utilizada na prática clínica. É uma droga que age inibindo a síntese da parede microbiana, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas. Possui meia vida elevada, alcançando elevados picos séricos. Possui maior atividade contra bacilos Gram-negativos aeróbios, utilizada no tratamento de escolha de meningite causada por bactérias Gram-negativas e outras multiresistentes da família Enterobacteraceae (Saleh et al., 2009; Salem & Saleh, 2002). A ceftriaxona em geral é um antibiótico bem tolerado. Possuindo relativa estabilidade na presença de β -lactamases, tendo uma alta afinidade pelas proteínas (Freitas, 2014).

1.9 Efeitos da Ceftriaxona no SNC

Através de um estudo realizado com aproximadamente 1040 drogas aprovadas pelo FDA foi descoberto que muitos antibióticos β -lactâmicos são potentes estimuladores da expressão de GLT-1. Em animais, o antibiótico β -lactâmico ceftriaxona aumentou tanto a expressão de GLT-1 quanto sua atividade bioquímica e funcional no cérebro (Rothstein et al., 2005). Portanto, a ceftriaxona tem propriedade reconhecida como estimuladora da expressão de GLT-1, resultando em efeitos neuroprotetores tanto em modelos *in vitro* quanto em modelos *in vivo*. Em geral esta atividade neuroprotetora é baseada, em parte, na sua habilidade de inibir morte celular neuronal por hiperexcitabilidade glutamatérgica (Lee et al., 2008).

A ceftriaxona atua pela elevação da transcrição de GLT-1 através da cascata de sinalização do fator nuclear κ - β (NF- κ β) promovendo a translocação nuclear da proteína p65 e a ativação da NF- κ β . A ligação do primer de EAAT2 no sítio específico da NF- κ β na serina 272 é responsável pela indução do GLT-1 mediada pela ceftriaxona. Por este mecanismo a ceftriaxona modula os níveis de glutamato na fenda sináptica e a ligação deste neurotransmissor aos seus receptores (Lee et al., 2008).

1.10 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas celulares dinâmicas que são transportadas em proteínas do citoesqueleto. Elas se fundem e dividem-se, fragmentam-se, incham, estendem e são recicladas (mitofagia ou formação de vesículas) constantemente e de forma bem regulada. Um desequilíbrio na fusão leva ao alongamento da mitocôndria, enquanto que o mesmo na fissão acarreta numa excessiva fragmentação da mitocôndria e diminuição do seu tamanho, ambos prejudicando a função da mitocôndria (Chen, McCaffery, & Chan, 2007).

A função fisiológica predominante da mitocôndria é a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, mas funções adicionais incluem a geração e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), envolvimento em algumas formas de apoptose, regulação do cálcio citoplasmático e da matriz mitocondrial, síntese e catabolismo de metabólitos e transporte das próprias organelas para suas corretas localizações dentro da célula. Uma anormalidade em qualquer um desses processos pode ser definida como uma disfunção mitocondrial (Gneiger, 2014).

As mitocôndrias são compartimentalizadas em duas membranas lipídicas: a membrana celular externa e a membrana celular interna. A membrana externa é porosa e permite a passagem de substâncias de baixo peso molecular entre o citosol e o espaço intermembranas. A membrana interna provém uma barreira altamente eficiente ao fluxo de íons, abriga a cadeia de transporte de elétrons e cobre a matriz mitocondrial, que contém o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a β -oxidação (Reddy & Beal, 2005).

O ATP mitocondrial é gerado via fosforilação oxidativa (OXPHOS) dentro da membrana mitocondrial interna. Radicais livres são gerados como um subproduto da OXPHOS. Na cadeia respiratória, os complexos I e III vazam elétrons ao oxigênio produzindo, principalmente radicais superóxido. Os radicais superóxido são dismutados pela manganês superóxido dismutase (Mn-SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. O complexo I gera apenas para a matriz mitocondrial, já o complexo III gera tanto para o espaço intermembranas quanto para a matriz. Somado a isso, os componentes do TCA, incluindo a α -cetoglutarato desidrogenase, produzem radicais superóxido na matriz. Estes radicais livres gerados pela mitocôndria e os radicais superóxido são transportados para o citoplasma via canais aniônicos voltagem-dependentes participando da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e DNA (Reddy, 2009).

Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na membrana interna da membrana sob a forma de quatro complexos proteína-lipídios: o complexo I (NADH-ubiquinona oxidoredutase), o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoredutase), o complexo III (ubiquinol-citocromo C oxidoredutase) e o complexo IV (citocromo C oxidase, conforme a **Figura 6**. A cadeia respiratória mitocondrial possui ainda dois transportadores de elétrons, ubiquinona e citocromo C. Estes constituintes, bem como o complexo V, ATP sintase, formam o sistema de OXPHOS, que fornece o ATP necessário à célula (Ferreira, Aguiar, & Vilarinho, 2008).

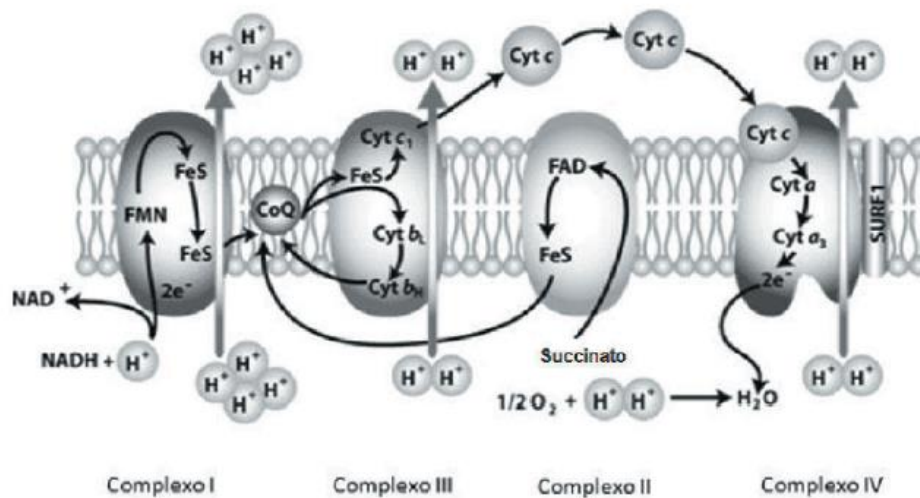


Fig. 6 – Representação esquemática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

A função global da cadeia respiratória é a oxidação de NADH e FADH₂, provenientes de outras vias metabólicas, bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceptor final, o oxigênio. Os complexos I, III e IV funcionam como uma bomba de prótons. Estes acumulam-se no espaço intermembrana, criando uma diferença de potencial eletroquímico, utilizado pela ATP sintase na formação de ATP a partir de ADP e Pi. A velocidade da respiração mitocondrial pode ser controlada pela disponibilidade de ADP (Gneiger, 2014).

O potencial de membrana é o principal componente da força próton-motiva gerada através da membrana mitocondrial interna e processo central no curso da OXPHOS. A eficiência da OXPHOS depende da natureza dos substratos respiratórios, os quais fornecem elétrons para a cadeia respiratória em diferentes níveis. Três sítios de acoplamento (CI, CIII e CIV) estão envolvidos na respiração, com substratos relacionados a CI, enquanto que apenas dois sítios de acoplamento (CIII e CIV) estão

ativos na rota da transferência de elétrons do succinato (substrato relacionado a CII) para o oxigênio. O potencial de membrana é frequentemente utilizado como uma leitura indireta do estado metabólico e da atividade da mitocôndria (Scaduto & Grotyohann, 1999; Solaini et al., 2007).

Anormalidades na mitocôndria são fatores importantes na patofisiologia de varias doenças neurológicas e neuropsiquiátricas o que tem aumentado o interesse no entendimento da fisiologia mitocondrial a as suas respostas a modificações do microambiente celular, ou nas interações com as células vizinhas, como por exemplo na cooperações neurônio-glia (Chowdhury et al., 2015). Por exemplo, o uso de bloqueadores do canal do NMDAr diminuem o influxo de cálcio intracelular nos neurônios e o inchamento mitocondrial (Alano et al., 2002; Peng et al., 1998; Prentice, Modi, & Wu, 2015).

PARTE II

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo primário deste trabalho foi investigar se a CEF modula o comportamento agressivo induzido pelo DN, através da regulação da expressão do GLT-1, níveis de glutamato e pNR2B^{ser1232}.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do tratamento com DN e CEF sobre:

2.2.1 Parâmetros comportamentais: locomoção espontânea no campo aberto; comportamento agressivo pelo teste do intruso;

2.2.2 Parâmetros neuroquímicos astrocitários: níveis de glutamato e imunoconteúdo de GLT-1 no córtex;

2.2.3 Parâmetros neuroquímicos neuronais: imunoconteúdo da subunidade NR2B (total e fosforilada na serina 1232) no córtex;

2.2.4 Atividade mitocondrial: controle respiratório, produção de H₂O₂ e potencial de membrana mitocondrial.

3. Metodologia

3.1 Animais e tratamento

Neste estudo foram utilizados 240 camundongos albinos da linhagem CF-1 com 60 a 70 dias de idade e peso entre 40 e 50 g, oriundos do Biotério Central da UFRGS. Ao completarem dois meses de idade estes animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram mantidos em caixas-moradia (4 animais por caixa), confeccionadas em plexiglass, medindo 25x0,9x17 cm, com assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (luzes acesas das 7:00 às 19:00 horas), com ração padronizada e água *ad libitum*. Após um período de habituação às instalações de duas semanas iniciou-se o tratamento com animais entre 2 e 3 meses de idade.

Os animais foram divididos em 5 grupos: a) (ND) animais tratados com Decanoato de Nandrolona via subcutânea (s.c.) na dose de 15 mg/Kg (dose suprafisiológica que mimetiza, por exemplo, o abuso desta droga por atletas) por 19 dias mais solução salina via intraperitoneal (i.p.) por 19 dias (n=30); b) (CEF) animais tratados com veículo oleoso via subcutânea por 19 dias, mais solução salina via intraperitoneal por 14 dias mais Ceftriaxona via intraperitoneal na dose de 200 mg/Kg por 5 dias (n=30); c) (ND/CEF) animais tratados com Decanoato de Nandrolona via subcutânea na dose de 15 mg/Kg por 19 dias, mais solução salina via intraperitoneal por 14 dias, mais Ceftriaxona via intraperitoneal na dose de 200 mg/Kg por 5 dias (n=30); d) (VEH) animais tratados com veículo oleoso via subcutânea por 19 dias mais solução salina via intraperitoneal por 19 dias nos mesmos volumes (n=30); e) (INTRUSO) animais não tratados, utilizados apenas no teste de agressividade como animal intruso ao ambiente familiar ao residente (n=120).

Cada animal recebeu duas injeções diárias, no turno da manhã (entre 10:00 e 11:00 horas) (Kalinine et al., 2014), nos volumes aproximados de 50µl para o DN e veículo oleoso e 150µl para Ceftriaxona e solução salina conforme tabela abaixo:

TRATAMENTOS	GRUPOS			
	ND (n=30)	CEF (n=30)	ND/CEF (n=30)	VEH (n=30)
Nandrolona	19 dias	X	19 dias	X
Ceftriaxona	X	5 dias (15° ao 19°)	5 dias (15° ao 19°)	X
Salina	19 dias	14 dias (1° ao 14°)	14 dias (1° ao 14°)	19 dias
Óleo	X	19 dias	X	19 dias

3.2 Parâmetros comportamentais

3.2.1 Campo Aberto

O aparato de campo aberto consiste em uma arena quadrada de madeira MDF com 50x50x50 cm como medidas e na cor preta. A exploração em Campo Aberto foi feita com o objetivo de avaliar a atividade locomotora e exploratória espontânea dos animais. O aparato foi dividido virtualmente em dois quadrantes (quadrante periférico: 50x50cm; e quadrante central: 30x30 cm) utilizando o programa ANY-MAZE®. A exploração dos animais foi filmada durante 10 min com o auxílio de uma câmera de vídeo localizada sobre o centro do aparato para posterior análise dos resultados com o auxílio do mesmo programa. Entre a tarefa com cada animal o aparato foi limpo com álcool 70 %. A iluminação utilizada no centro do Campo Aberto foi de 7 lux. Os animais foram filmados por 10 minutos de acordo com o protocolo já descrito (Kazlauckas et al., 2005), e o teste foi realizado no 18º dia de tratamento.

A distância total percorrida no aparato, distância percorrida minuto a minuto, velocidade máxima, velocidade média, tempo total móvel e tempo total imóvel foram consideradas como medidas da atividade locomotora e comportamento exploratório.

3.2.2 Teste do Intruso/Residente

Previamente ao dia do teste os animais permaneceram sem a troca de maravalha por um período de dois dias a fim de garantir a demarcação territorial por parte dos animais residentes. O teste do comportamento agressivo foi realizado imediatamente após o animal permanecer isolado em sua caixa de origem por dois minutos. Transcorrido este tempo, um macho intruso foi inserido dentro do território do macho residente: tanto o roedor intruso quanto o residente foram testados apenas uma vez na tarefa. Os comportamentos dos animais foram registrados durante a execução do teste por dez minutos com o auxílio do programa ANY-MAZE®. Foram analisados os comportamentos como postura dominante, postura subordinada, postura neutra, latência do primeiro ataque e número de ataque conforme o protocolo descrito previamente (Kazlauckas et al., 2005).

Quando o comportamento agressivo infligiu algum tipo de dano ou injúria aos animais como sangramento ou sofrimento, o teste foi imediatamente interrompido e os animais excluídos da análise e eutanasiados.

O teste do Intruso residente foi realizado no 20º dia, 24 h após o final do tratamento.

3.3 Coleta de amostras

Logo após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados por via respiratória, em câmara de isoflurano e oxigênio para coleta do líquido e posterior decapitação. Subsequentemente foi removido o córtex para as análises neuroquímicas. Os cérebros foram imediatamente removidos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl, 0.63 Na₂HPO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂ e 5.55 de glicose, pH 7.2. Cada um dos hemisférios foi processado diferentemente de acordo com as técnicas descritas abaixo.

3.4 Avaliação Neuroquímica

3.4.1 Procedimento Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As concentrações de aminoácidos livres no líquido foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com Joseph e Marsden (1986). Para quantificar os níveis de aminoácidos (glutamato), utilizou-se alíquotas de sobrenadante livre de células de LCR. Foi utilizada uma coluna de fase inversa (Supelcosil LC-18, 250 mm × 4,6 mm x 5 µm, Supelco) num cromatógrafo líquido Shimadzu Instruments ("loop" de injeção de 50 µL, volume de injeção de 40 µL). Foi empregada detecção fluorescente após derivatização pré-coluna utilizando 100,5 uL de OPA (5,4 mg de OPA em 1 mL de borato de silício 0,2 M pH 9,5), mais 25,5 uL de mercaptoetanol a 4 % durante 3 minutos. A fase móvel fluiu a uma taxa de 1,4 mL / min à temperatura de 25 °C na coluna. A composição dos tampões A e B é respectivamente: **A:** tampão monohidratado de di-hidrogenofosfato de sódio a 0,04 mol / L, pH 5,5, contendo 80% de metanol; **B:** tampão monohidratado de di-hidrogenofosfato de sódio 0,01 mol / L, pH 5,5, contendo 20% de metanol. O perfil de gradiente foi modificado de

acordo com o teor de tampão B na fase móvel: 100% em 0.10 min, 90 % em 15 min, 48 % em 10 min, 100% em 60 min. A absorbância foi lida nos comprimentos de onda de 360 nm e 455 nm, excitação e emissão respectivamente, num detector de fluorescência Shimadzu. Foram utilizadas amostras de 20 μ L e a concentração foi expressa em μ M (como média \pm SEM). Os aminoácidos foram identificados pelo seu tempo de retenção e foram quantitativamente determinados utilizando a sua área do pico cromatográfico. Utilizou-se uma mistura padrão de aminoácidos conhecida para a calibração (Joseph, 1986). A coleta de líquido foi realizada imediatamente após o teste do intruso.

3.4.2 Immunoblotting

Imediatamente após a coleta de líquido os animais foram eutanasiados, como descrito anteriormente, para a retirada do córtex.

O córtex direito foi homogeneizado em tampão PIK (150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10% glicerol, 1 mM Cl_2Ca , 1mM Cl_2Mg e 1% NP-40) juntamente com coquetel de inibidor de protease. O protocolo foi realizado de acordo com (Muller et al., 2011). O conteúdo proteico foi determinado usando o ensaio do ácido bicinonínico (BCA) e albumina sérica bovina como curva padrão. As frações corticais foram diluídas a uma concentração proteica final de 2 μ g/ μ l com solução de amostra (375mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50 % glicerol, 0.25 % azul de bromofenol, 0.25 M DTT e 2.5 % mercaptoetanol). As amostras foram corridas no mesmo gel, após a eletroforese, as membranas foram incubadas por uma noite com salina tamponada com Tris (TBS-T) 0,1 % contendo Tween 20 e BSA a 5 %. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 24h a 4 °C com anticorpo específico para as proteínas de interesse. Após a incubação dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina por 2h em temperatura ambiente e analisadas com kit ECL.

3.5 Avaliação metabólica

3.5.1 Respirometria

Imediatamente após a coleta de líquido os animais foram eutanasiados, como descrito anteriormente, para obtenção do cérebro total. Os animais utilizados para a respirometria não foram os mesmos utilizados para o imunoblotting.

O cérebro inteiro do animal foi rapidamente removido e homogeneizado em um meio de Sacarose (sacarose 320 mM, BSA a 0,1 %, pH 7,4) e, em seguida, utilizou-se uma amostra de 100 uL para as medições de respiração realizadas num tampão de respiração padrão (50 mM de KCl, 320 mM de manitol, 4 mM de Mg, 4 mM de fosfato, 0,7 mM de EDTA, 10 mM de TRIS, pH 7,4).

O consumo de oxigênio foi medido utilizando o sistema Oxygraph-2k de alta resolução em tempo real (Oroboros, Innsbruck, Áustria). Para o isolamento de sinaptossomas, utilizamos os mesmos protocolos em Percoll descritos anteriormente (Muller et al., 2013), resultando em uma banda enriquecida em sinaptossoma. Os resultados foram normalizados para a concentração de proteína obtidas pelo ensaio de BCA (Smith et al., 1985).

Todos os experimentos foram realizados com temperatura de 37 ° C em câmara de 2 ml, com protocolo modificado de titulação de múltiplos substratos conforme previamente descritos em detalhe, consistindo na adição sequencial de Succinato (S, 10 mM) ; Adenosina difosfato (ADP, 2,5 mM) e Cianeto (KCN 5 mM) (Gnaiger, 2014).

Portanto, usando o DatLab 6.0, os valores de fluxo por massa foram obtidos da respiração estabilizada após cada titulação, para determinar diferentes estados mitocondriais. O estado basal (Estado II) foi obtido antes da adição de succinato, a capacidade da fosforilação oxidativa (OXPHOS) foi obtida após a titulação do ADP na presença de succinato (Estado III) e respiração não mitocondrial (ROX) após KCN.

O controle respiratório (RCR) foi calculado como a razão de estado III / estado II, no entanto, para fins estatísticos foi expresso como fator de fluxo de OXPHOS, calculado como (Estado III-Estado II) / Estado III (Gnaiger, 2014).

3.5.2 Produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em sinaptossomas de cérebro inteiro foi avaliada pelo método de oxidação Amplex Red (n = 6 por grupo). Os mesmos substratos, utilizados para respirometria foram utilizados como uma estratégia para a geração de H₂O₂ no mesmo tampão de respiração suplementado com 10 M Amplex Red e 2 unidades / mL de HRP. O nível basal de H₂O₂ foi medido sem a presença de substrato no meio de incubação, o succinato foi utilizado como substrato para estimular a respiração mitocondrial, o ADP para analisar a capacidade funcional das mitocôndrias para produzir ATP e cianeto para acessar a produção não-mitocondrial de H₂O₂. A fluorescência foi monitorizada com comprimentos de onda de excitação (563 nm) e emissão (587 nm) com um leitor de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices, EUA). Os resultados estão expressos nos gráficos pelos valores brutos.

3.5.3 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O $\Delta\Psi_m$ foi medido utilizando o sinal de fluorescência do corante catiônico, safranina-O. Amostras de sinaptossomas de cérebro inteiro foram incubadas no tampão de respiração utilizado no protocolo de respirometria suplementado com safranina O 10 μ M. A fluorescência foi detectada com um comprimento de onda de excitação de 495 nm e um comprimento de onda de emissão de 586 nm (Spectra Max M5, Molecular Devices). Os dados são expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (AFUs) e quanto maior a fluorescência menor o potencial de membrana (Portela et al., 2016). Os resultados estão expressos nos gráficos pelos valores brutos.

3.6 Desenho experimental

O DN foi administrado por 19 dias e a CEF por 5 dias, nos dias finais de tratamento. No 18º dia foi realizado o teste do campo aberto, no 20º dia, 24h após o término do tratamento, foi realizado o teste do intruso. Imediatamente após o teste do intruso foi feita a coleta de líquido destes animais seguida da eutanásia, onde foram

separados o cérebro total para preparação do sinaptossoma (para respirometria) e o córtex (para imunobloting). Os animais usados na respirometria não foram os mesmos usados para imunobloting. Abaixo segue linha de tempo ilustrativa do experimento:

DESENHO EXPERIMENTAL:



3.7 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA de uma ou duas vias, seguido pelo teste múltiplo de Tukey para dados paramétricos, ou Kruskal Wallis seguido de Dunn's para dados não-paramétricos. Para avaliar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram avaliados pelo programa SPSS versão 20 e GraphPadPrism versão 6. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Parâmetros comportamentais

4.1.1 Avaliação da atividade locomotora e exploratória no campo aberto

Os resultados demonstram que os tratamentos realizados neste estudo não alteraram a atividade locomotora e exploratória dos animais, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos ND (n=12), CEF (n=12) e ND/CEF (n=12) em relação ao grupo VEH (n=12), quando avaliadas a distância total percorrida, as velocidades máxima e média e os tempos móvel e imóvel dos animais (**Figura 7**).

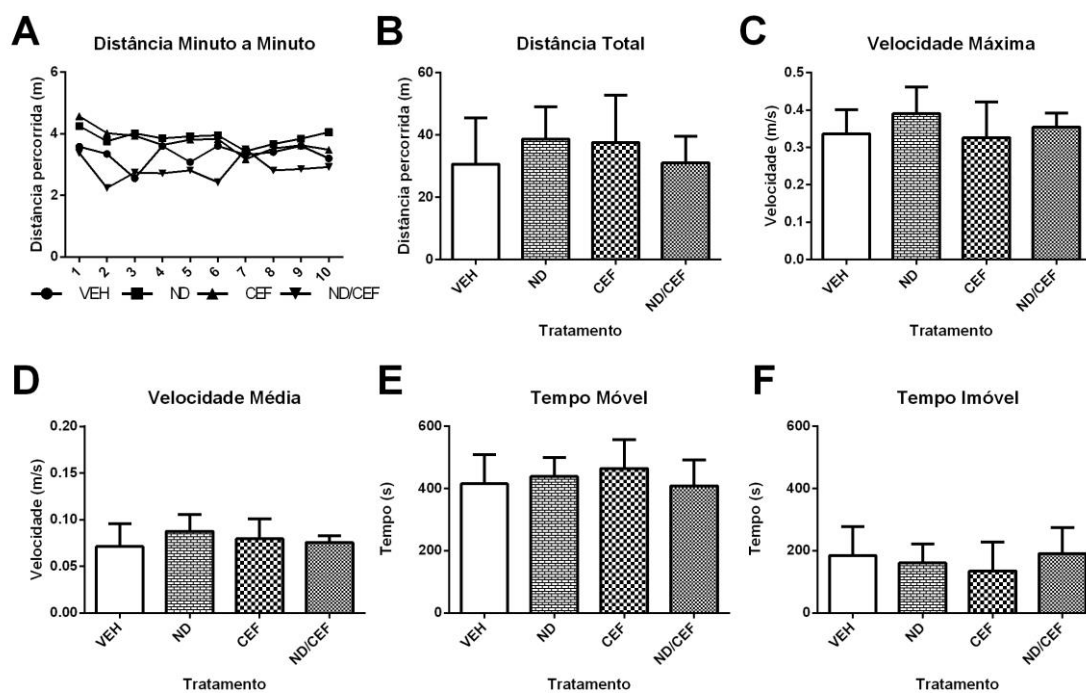


Fig. 7 – Gráficos obtidos da análise no aparato campo aberto. **(A)** distância total percorrida no aparato minuto a minuto (m), **(B)** distância total percorrida no aparato (m), **(C)** velocidade máxima (m/seg), **(D)** velocidade média (m/seg), **(E)** tempo total móvel no aparato (s) e **(F)** tempo total imóvel no aparato (s). os resultados foram expressos como média e erro padrão, n=6 por grupo.

4.1.2 – Avaliação do comportamento agressivo

Para a avaliação do comportamento agressivo os grupos foram comparados em relação ao tempo de latência do primeiro ataque e o número de ataques inferidos por um animal residente sobre um animal intruso. O tempo de latência do primeiro ataque foi significativamente menor no grupo ND em relação aos outros três grupos de tratamento. Igualmente, o grupo ND apresentou um número significativamente maior de ataques em relação aos outros três outros grupos de tratamento (**Figura 8**).

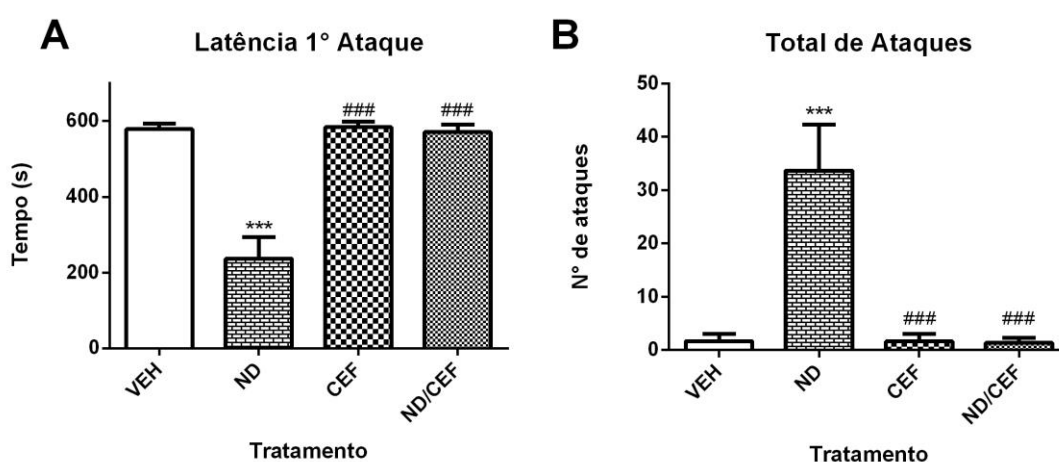


Fig 8 – Gráficos obtidos da análise do teste do intruso. (A) Tempo de latência do primeiro ataque (s) e (B) número total de ataques. O * representa diferença em relação ao grupo VEH. O # representa diferença em relação ao grupo ND. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=12 por grupo, p<0,05.

4.2 Parâmetros neuroquímicos

4.2.1 – Níveis de glutamato no líquor

O grupo ND apresentou níveis significativamente maiores de glutamato que o grupo VEH e que o grupo ND/CEF, não houve diferença significativa entre ND e CEF, mas há uma tendência de aumento no glutamato no líquor de ND em relação à CEF. Entre os grupos VEH, CEF e ND/CEF não houve diferença com relação a concentração de glutamato no líquor.

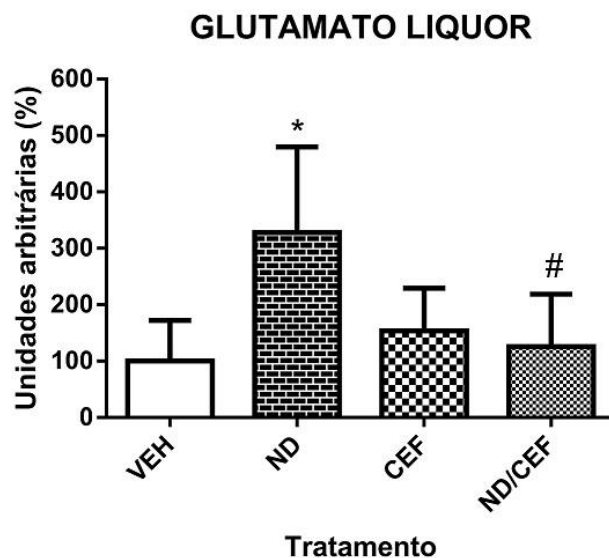


Fig 9 – Gráfico obtido da análise do conteúdo, em μM , de glutamato no líquido cefalorraquidiano por HPLC. O * representa diferença significativa em relação ao grupo VEH e o # representa diferença significativa em relação ao grupo ND. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao grupo VEH (%), com média e desvio padrão, $n=5$ por grupo e $p<0,05$.

4.2.2 – Determinação do imunocconteúdo de GLT-1

Os tratamentos com ND e ND/CEF apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo VEH. Houve um aumento significativo de GLT-1 do grupo ND/CEF em relação ao grupo ND. Os níveis de GLT-1 do grupo CEF não foram significativamente diferentes do grupo VEH.

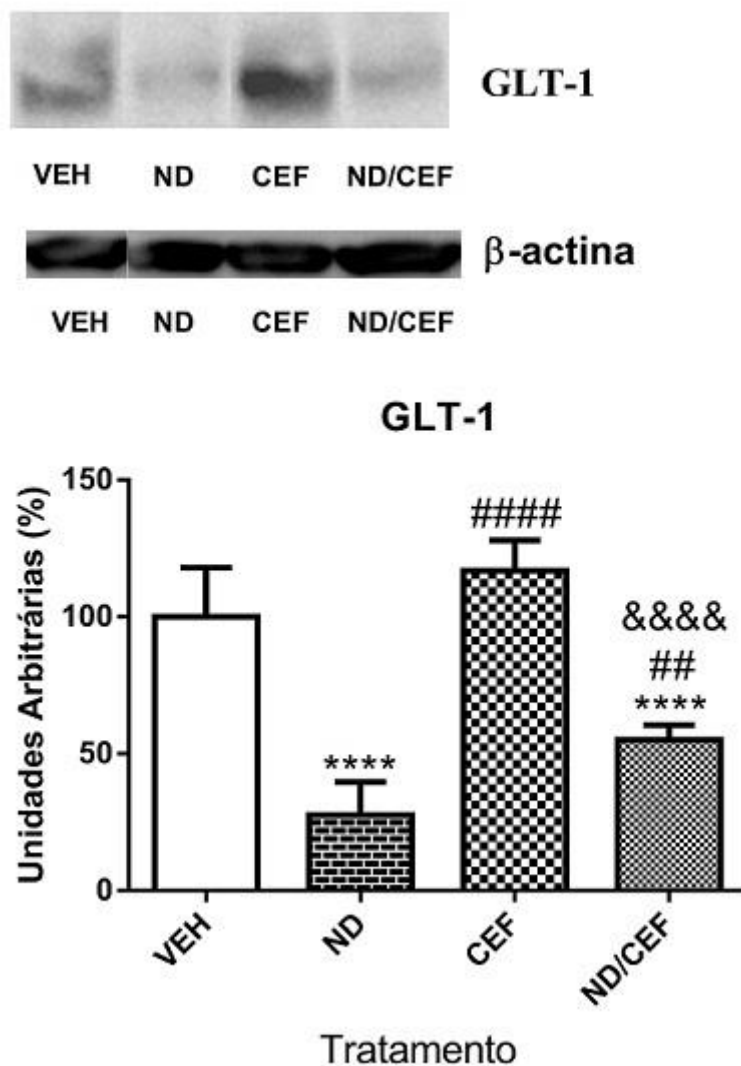


Fig 10 – Gráfico obtido através da determinação do imunoconteúdo de GLUT-1 por *Western Blot* em homogeneizado de córtex. O * representa diferença significativa em relação ao grupo VEH, o # representa diferença significativa ao grupo ND e & representa diferença significativa ao grupo CEF. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao grupo VEH (%), com média e desvio padrão, n=7 por grupo, p<0,001 quando quatro caracteres na barra e p<0,005 quando menos de quatro caracteres nas barras.

4.2.3 – Determinação do imunoconteúdo do receptor glutamatérgico ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDAr) subunidade NR2B total e fosforilada na serina 1232.

A figura 11(A) mostra o imunoconteúdo do NR2B total no córtex. Não houve diferença estatística entre os grupos. A figura 11(B) mostra o imunoconteúdo do pNR2B^{Ser1232}. Não houve diferença estatística entre os grupos.

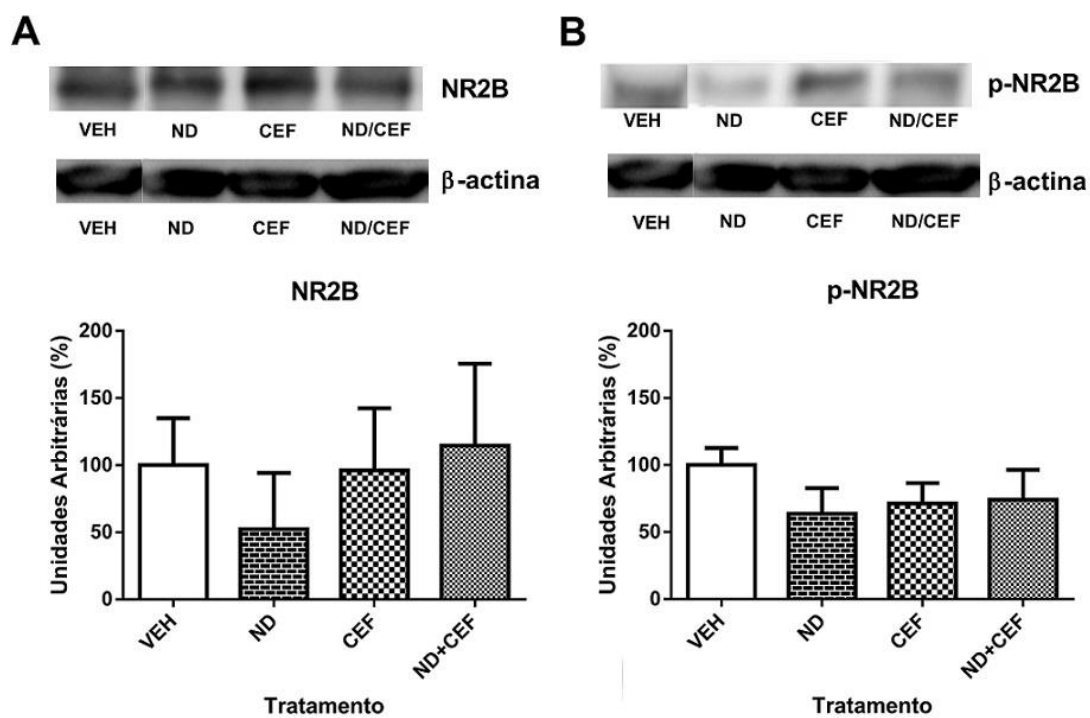


Fig 11 - Gráficos obtidos através da determinação do imunoconteúdo de NMDAr por *Western Blot* em homogeneizado de córtex. (A) Determinação do imunoconteúdo da subunidade NR2B total do receptor NMDA e (B) determinação do imunoconteúdo da subunidade NR2B fosforilada do receptor NMDA. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao grupo VEH (%), com média e desvio padrão, n=6 por grupo.

Foi feita a razão da proteína fosforilada em relação a total (**figura 12**). Houve um aumento significativo na razão p-NR2B/NR2B no grupo ND em relação aos demais grupos.

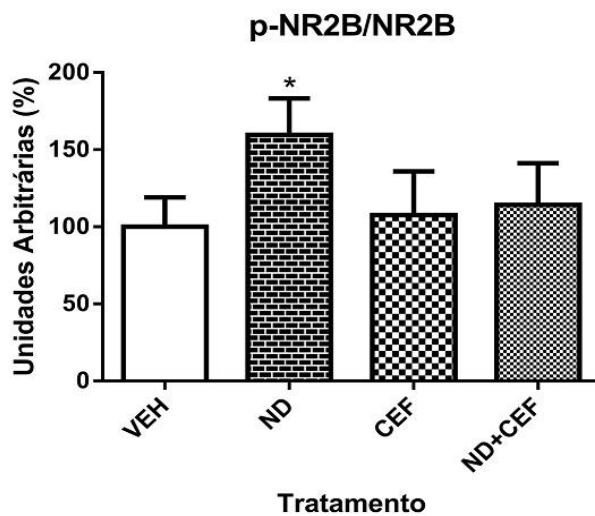


Fig 12 – Gráfico obtido através da determinação da razão entre os imunocorrelatos de p-NR2B e NR2B total obtidos por *Western Blot* em homogeneizados de córtex. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao grupo VEH (%), com média e desvio padrão, n=6 por grupo e p<0,05.

4.3 Parâmetros metabólicos

4.3.1 Capacidade respiratória mitocondrial

Com relação ao consumo de oxigênio basal, os grupos não apresentaram diferença significativa.

O consumo de oxigênio estimulado pelo succinato aumentou significativamente em todos os grupos em relação ao seu estado basal. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos.

O grupo ND demonstrou uma diminuição significativa no controle respiratório em relação aos grupos VEH, CEF e ND/CEF. Os grupos CEF e ND/CEF apresentaram valores similares aos do grupo VEH (**figura 13**).

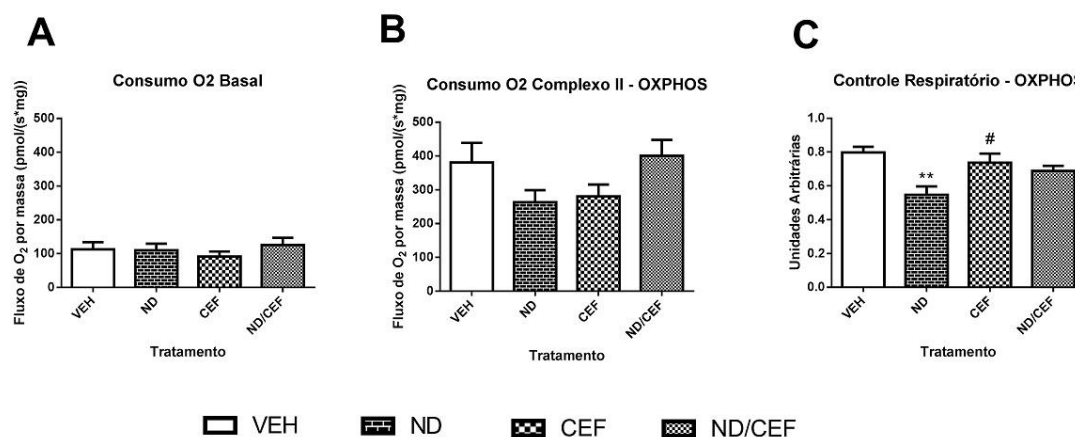


Fig 13 – Gráficos obtidos da análise da respirometria de sinaptossomas em um respirômetro de alta resolução em tempo real. (A) Consumo de oxigênio no estado basal, (B) consumo de oxigênio pelo complexo II e (C) controle respiratório da fosforilação oxidativa. O * representa diferença estatística em relação ao grupo VEH e o # representa diferença estatística em relação ao grupo ND. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=6 por grupo e p<0,05.

4.3.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os grupos ND, CEF e ND/CEF apresentaram aumento significativo na produção de peróxido, no estado basal, quando comparados ao grupo VEH. Além disso o grupo ND apresentou um aumento significativo na produção de peróxido em comparação ao grupo CEF. Não houve diferença entre os grupos ND e ND/CEF e entre os grupos CEF e ND/CEF.

Após a adição de succinato, houve um aumento significativo na produção de peróxido em todos os grupos em relação ao seu estado basal. Ainda houve um aumento significativo na produção de peróxido nos grupos ND e ND/CEF em relação ao grupo VEH.

Quando adicionamos ADP houve uma diminuição significativa na produção de peróxido em todos os grupos em relação ao estado estimulado pelo succinato e, os grupos ND, CEF e ND/CEF apresentam aumento significativo em relação ao grupo VEH (**figura 14**).

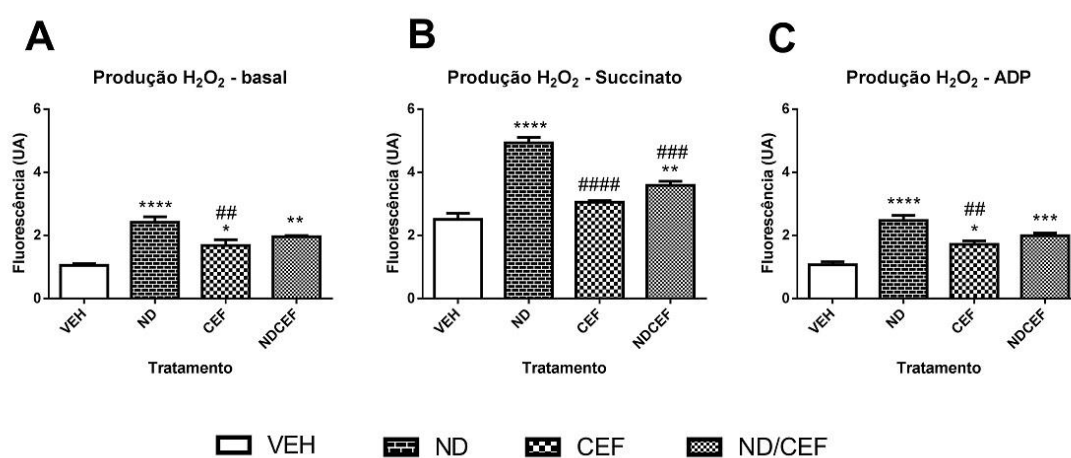


Fig 14 – Gráficos obtidos da análise do teste de amplex red em sinaptossomas. (A) Produção de peróxido de hidrogênio no estado basal, (B) produção de peróxido de hidrogênio após a adição de succinato e (C) produção de peróxido de hidrogênio após adição de ADP. O * representa diferença significativa em relação ao grupo VEH, o # representa diferença significativa ao grupo ND. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=6 por grupo, p<0,001 quando quatro caracteres na barra e p<0,005 quando menos de quatro caracteres nas barras.

4.3.3 Potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)

No estado basal os grupos ND e ND/CEF apresentaram uma fluorescência significativamente maior do que o grupo VEH e o grupo CEF, além disso a fluorescência foi significativamente maior no grupo ND em relação ao grupo ND/CEF.

Após a adição de succinato gera-se um potencial de ação na membrana mitocondrial que foi significativamente menor nos grupos ND e CEF em relação ao grupo VEH e maior no grupo ND/CEF em relação ao grupo VEH. Os grupos ND e CEF apresentaram o mesmo comportamento em relação ao potencial de ação e foram significativamente menores do que o grupo ND/CEF.

Quando é adicionado o ADP há uma diminuição no potencial de ação de todos os grupos em relação ao estado anterior. O grupo ND apresentou um potencial significativamente maior do que todos os outros grupos de tratamento, que não apresentaram diferença significativas entre si. A maior diferença no potencial do grupo ND se deu em relação ao grupo CEF, seguido do grupo VEH e do grupo ND/CEF (**figura 15**).

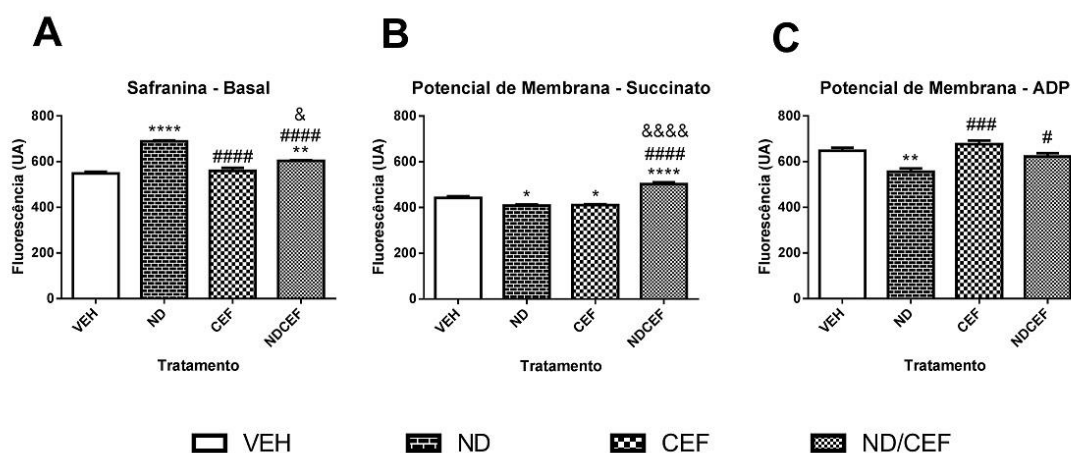


Fig 15 – Gráficos obtidos da análise do teste de safranina em sinaptossomas. (A) Absorção da safranina no estado basal, (B) potencial de membrana após a adição de succinato e (C) potencial de membrana após a adição de ADP. O * representa diferença significativa em relação ao grupo VEH, o # representa diferença significativa ao grupo ND e & representa diferença significativa ao grupo CEF. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, n=6 por grupo p<0,001 quando quatro caracteres na barra e p<0,005 quando menos de quatro caracteres nas barras.

PARTE III

5 Discussão

Esse estudo teve como objetivo principal investigar se o aumento da expressão da GLT-1 pela CEF seria capaz de modular os níveis de glutamato e de pNR2B^{ser1232} e reduzir o comportamento agressivo induzido pelo ND. Os resultados demonstraram que a administração de CEF diminuiu a agressividade induzida pelo ND. Mecanicamente estes efeitos foram associados ao aumento da expressão de GLT-1, e diminuição dos níveis de glutamato e de pNR2B^{ser1232}. Desta maneira estes resultados sugerem que uma diminuição da hiperexcitabilidade glutamatérgica via receptor NMDA é capaz de modular o comportamento agressivo. Estes resultados comprovam nossa hipótese inicial.

Primeiramente, foi realizado o teste de locomoção espontânea no campo aberto para avaliar o impacto dos tratamentos realizados no perfil exploratório dos animais. Considerando que o teste do intruso requer uma capacidade locomotora preservada para que os animais expressem seu comportamento agressivo, o teste no campo aberto foi realizado para garantir que não houvesse interferência dos tratamentos neste parâmetro o que poderia afetar a confiabilidade dos resultados do teste do intruso. Assim, em um animal com mobilidade comprometida não poderia ser quantificado seu real padrão de resposta à presença do intruso. O aumento do GLT-1 associado a uma diminuição dos níveis de glutamato poderia mecanicamente causar sedação e imobilidade. Por outro lado, altos níveis de glutamato poderiam causar hiperlocomoção. Entretanto, os tratamentos realizados com ND e CEF não afetaram a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto em camundongos CF-1. Estes resultados corroboram resultados da literatura uma vez que diversos trabalhos já demonstraram não haver uma interferência dos EAA na locomoção espontânea (Bitran, Kellogg, & Hilvers, 1993; Clark & Harrold, 1997; Martinez-Sanchis, Aragon, & Salvador, 2002; Minkin, Meyer, & van Haaren, 1993). Com relação à ceftriaxona a literatura é escassa no que se refere à locomoção espontânea, mas um estudo (Barichello et al., 2005) mostrou que em uma sessão de habituação ao aparato do campo aberto não houve diferença na atividade exploratória de ratos Wistar machos tratados com ceftriaxona quando comparados ao grupo controle.

No teste do intruso avaliamos o tempo de latência para o primeiro ataque e número de ataques desferidos de um camundongo residente à um camundongo intruso para caracterizar e quantificar o comportamento agressivo. Diferentes estudos reforçam

que estes parâmetros são uma importante ferramenta para analisar o fenótipo agressivo em roedores e principalmente envolve a participação de áreas cerebrais e feixes nervosos que possuem um alto nível de correlação funcional com humanos (Clark & Henderson, 2003; McGinnis, 2004). Demonstramos que camundongos CF-1 tratados com ND por 19 dias apresentaram agressividade exacerbada quando comparados aos grupos VEH e demais grupos de tratamento. Outro aspecto importante deste protocolo é que os níveis de agressividade do grupo CEF e ND/CEF foram similares aos do controle. O tempo de latência (segundos) para o primeiro ataque do grupo ND foi significativamente menor que os outros grupos, o que indica uma maior impulsividade. Ainda, o número de ataques do grupo ND foi significativamente maior em relação aos outros grupos. Diversos estudos já relataram que o ND aumenta o fenótipo agressivo em roedores. Entre eles, o de LONG (Long et al., 1996) demonstrou que ratos *Sprague-Dawley* que receberam ND (2mg/dia/rato) durante quatro semanas apresentaram altos níveis de agressividade quando comparados ao grupo controle. Usando um teste de competição para a ingestão de água como medida de agressividade, ratos machos tratados com ND demonstraram dominância diante do acesso ao bebedouro em relação ao grupo controle (Lindqvist et al., 2002). Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que a administração crônica de ND foi responsável pelo aumento do fenótipo agressivo em camundongos CF1 por mecanismos associados a diminuição do GLT-1 no córtex e hipocampo e aumento dos níveis de glutamato. A memantina e MK801, dois antagonistas do NMDAr foram capazes de diminuir o fenótipo agressivo. (Kalinine et al., 2014). Portanto, alterações em componentes astrocíticos da maquinaria glutamatérgica levam a ruptura da sinalização glutamatérgica, e ao comportamento agressivo via NMDAr.

Estudos demonstram que o aumento da concentração de glutamato no córtex está diretamente relacionado ao aumento da agressividade (Bechtholt-Gompf et al., 2010; Ghanizadeh & Namazi, 2010). Nossos dados vão ao encontro deste estudo, uma vez que o grupo tratado com ND apresentou níveis baixos no imunoconteúdo de GLT-1 e altos níveis de glutamato no líquido, e o grupo ND/CEF apresentou níveis de GLT-1 superiores aos do grupo ND, enquanto os níveis de glutamato foram similares ao grupo VEH. Embora, os antibióticos β -lactâmicos, incluindo a ceftriaxona, sejam capazes de aumentar a expressão de GLT-1 fornecendo efeitos neuroprotetores (Rothstein et al., 2005) poucos estudos tem sido realizados para investigar seu efeito neuromodulador na agressividade. Assim, nossos resultados fortalecem a hipótese de que a administração de

ceftriaxona pode reverter o fenótipo agressivo induzido pelos EAA através do aumento no imunoconteúdo de GLT-1 e aumento da captação de glutamato extracelular pelos astrócitos, diminuindo assim a hiperexcitabilidade do NMDAr. O estudo de BORTOLATO (Bortolato et al., 2012) demonstrou o envolvimento das subunidades regulatórias NR2A e NR2B do NMDAr no córtex pré-frontal mediando o fenótipo agressivo, mostrando que a administração de antagonistas do NMDAr reduziram significativamente a agressividade em camundongos Knockouts para monoamino oxidase A. Nossos resultados avançam no sentido de demonstrar que a agressividade e os níveis de fosforilação da subunidade regulatória NR2Bser1232 parecem ser dependentes da expressão do GLT-1, proporcionando assim alvos moleculares para serem investigados em outras condições que envolvem comportamento agressivo.

Conforme demonstrado no presente estudo e reforçando a literatura recente, o uso crônico de esteroides induz a agressividade e alterações na homeostase glutamatérgica. O comportamento agressivo é comumente manifestado juntamente com outros sintomas comportamentais em diferentes doenças neurodegenerativas (Woolley et al., 2011). Adicionalmente, alterações comportamentais envolvem também a ruptura da conectividade cerebral e prejuízos no metabolismo energético (Buckner et al., 2005; Lustig et al., 2003). Dessa forma, investigamos também o impacto da ruptura da homeostase glutamatérgica e agressividade causada pela ND no metabolismo mitocondrial (Demetrius, Magistretti, & Pellerin, 2014; Kraguljac et al., 2016; Ribeiro et al., 2017). Recentemente, foi demonstrado que o uso crônico de esteroides altera a conectividade cerebral de regiões envolvidas com o controle emocional e cognitivo (Westlye et al., 2017), o que neste contexto potencialmente pode ocorrer de forma concomitante a disfunções metabólicas (Kaufman et al., 2015; Morrison, Sikes, & Melloni, 2016), bem como disfunções decorrentes da excitotoxicidade glutamatérgica como a hiperexcitabilidade do receptor NMDA causando um maior influxo de Ca^{2+} , que quando captado pela mitocôndria, pode levar à disfunções mitocondriais como alterações no potencial de membrana e produção de peróxido de hidrogênio (Kalinine et al., 2014; Rossbach et al., 2007). Portanto, foram investigados parâmetros relacionados ao metabolismo mitocondrial em sinaptossomas de cérebro total. Preparações sinaptossomiais fornecem um modelo preciso para testar a função mitocondrial no SNC (Nicholls, 2010). A mitocôndria dentro do sinaptossoma fornece ATP para o citoplasma e membrana plasmática, e preserva o metabolismo, mantém o funcionamento de receptores e canais iônicos e da maquinaria para excitação e recaptação de

neurotransmissores (Nicholls, 2003). Os sinaptossomas são acessíveis a diversas técnicas empregadas para a avaliação de parâmetros bioenergéticos incluindo o potencial da membrana mitocondrial e taxas respiratórias, bem como a captação mitocondrial de Ca²⁺ (Nicholls, 2003).

A função mitocondrial está relacionada com a liberação de neurotransmissores e ativação das vesículas sinápticas (Verstreken et al., 2005). Embora os tratamentos não tenham induzido alterações nos valores brutos de consumo de oxigênio, o Controle Respiratório, principal indicador de função mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011) foi diminuído pelo tratamento com ND e revertido com a combinação com ceftriaxona. Adicionalmente, o aumento da produção de peróxido e ruptura no potencial de membrana mitocondrial induzido pelo tratamento com ND, evidenciam um potencial efeito negativo com o tratamento crônico que foi revertido parcialmente com a associação da ND/CEF. Estudos avaliando a relação entre mecanismos glutamatérgicos envolvidos na agressividade induzida pelo ND e o impacto na fisiologia mitocondrial são escassos. Entretanto, existem evidências demonstrando alterações negativas na funcionalidade integrada cerebral (Kaufman et al., 2015; Westlye et al., 2017) e também em marcadores de morte celular e proteínas associadas com processos neurodegenerativos (Ma & Liu, 2015).

Conforme a literatura, a CEF apresenta um efeito neuroprotetor e potencialmente pode atenuar indicadores de disfunção mitocondrial exercendo efeitos positivos no sistema antioxidante e inflamatório (Altas et al., 2013; Lee et al., 2008), nossos resultados demonstram que a ND causou alterações importantes no metabolismo mitocondrial e que a CEF reverteu parcialmente a diminuição do controle respiratório e o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias. Assim, é possível sugerir que associado ao aumento do fenótipo agressivo o uso de altas doses de ND também tem impacto negativo na função mitocondrial. Os efeitos a longo prazo destas alterações estão em investigação no nosso grupo.

Em resumo, a partir dos resultados deste trabalho, evidenciamos que: (I) O tratamento crônico com ND induz um fenótipo agressivo em roedores pela diminuição da remoção do glutamato extracelular e conseqüente acúmulo extracelular do mesmo no cérebro, gerando aumento de pNR2B^{ser1232} do NMDAr; (II) a administração de CEF por 5 dias é capaz de reverter este fenótipo agressivo pelo aumento da expressão do transportador GLT-1, associado a diminuição das concentrações extracelulares de glutamato e da expressão de pNR2B^{ser1232}; (III) o tratamento com ND causou prejuízos

à função mitocondrial diminuindo o controle respiratório, aumentando a produção de peróxido de hidrogênio; e (IV) a CEF reverteu parcialmente estes prejuízos a atividade mitocondrial.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a interação bidirecional entre o transportador astrocitário GLT-1 e a subunidade neuronal pNR2B^{ser1232} mediada pelo glutamato, exerce um impacto regulatório no fenótipo agressivo induzido pela ND e no controle respiratório mitocondrial. Desta maneira, este modelo reforça a importância da homeostasia funcional da sinapse tripartite glutamatérgica no fenótipo agressivo.

7 PERSPECTIVAS

Pretendemos avaliar a liberação de glutamato pelas vesículas sinápticas, captação de glutamato em fatias e o influxo de cálcio na mitocôndria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alano, C. C., Beutner, G., Dirksen, R. T., Gross, R. A., & Sheu, S. S. (2002). Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J Neurochem*, *80*(3), 531-538.
- Altas, M., Meydan, S., Aras, M., Yilmaz, N., Ulutas, K. T., Okuyan, H. M., & Nacar, A. (2013). Effects of ceftriaxone on ischemia/reperfusion injury in rat brain. *J Clin Neurosci*, *20*(3), 457-461. doi: 10.1016/j.jocn.2012.05.030
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, *32*(1), 1-14.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., & Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(8), 4155-4160.
- Bahrke, M. S., & Yesalis, C. E. (2004). Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*, *4*(6), 614-620. doi: 10.1016/j.coph.2004.05.006
- Bar-Peled, O., Ben-Hur, H., Biegon, A., Groner, Y., Dewhurst, S., Furuta, A., & Rothstein, J. D. (1997). Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *J Neurochem*, *69*(6), 2571-2580.
- Barichello, T., Martins, M. R., Reinke, A., Feier, G., Ritter, C., Quevedo, J., & Dal-Pizzol, F. (2005). Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*, *33*(1), 221-223; discussion 262-223.
- Bartsch, W., Krieg, M., & Voigt, K. D. (1980). Quantification of endogenous testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol in subcellular fractions of the prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle, skeletal muscle and heart muscle of the rat. *J Steroid Biochem*, *13*(3), 259-264.
- Basile, J. R., Binmadi, N. O., Zhou, H., Yang, Y. H., Paoli, A., & Proia, P. (2013). Supraphysiological doses of performance enhancing anabolic-androgenic steroids exert direct toxic effects on neuron-like cells. *Front Cell Neurosci*, *7*, 69. doi: 10.3389/fncel.2013.00069
- Bechtholt-Gompf, A. J., Walther, H. V., Adams, M. A., Carlezon, W. A., Jr., Ongur, D., & Cohen, B. M. (2010). Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory. *Neuropsychopharmacology*, *35*(10), 2049-2059. doi: 10.1038/npp.2010.74
- Bitran, D., Kellogg, C. K., & Hilvers, R. J. (1993). Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-related behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. *Horm Behav*, *27*(4), 568-583. doi: 10.1006/hbeh.1993.1041
- Bortolato, M., Godar, S. C., Melis, M., Soggiu, A., Roncada, P., Casu, A., Shih, J. C. (2012). NMDARs Mediate the Role of Monoamine Oxidase A in Pathological Aggression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *32*(25), 8574-8582. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0225-12.2012
- Brand, Martin D., & Nicholls, David G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, *435*(Pt 2), 297-312. doi: 10.1042/BJ20110162
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*, *24*(4), 136-141.
- Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Shannon, B. J., LaRossa, G., Sachs, R., Fotenos, A. F., Mintun, M. A. (2005). Molecular, Structural, and Functional Characterization of Alzheimer's Disease: Evidence for a Relationship between Default Activity,

- Amyloid, and Memory. *The Journal of Neuroscience*, 25(34), 7709-7717. doi: 10.1523/jneurosci.2177-05.2005
- Busardo, F. P., Frati, P., Sanzo, M. D., Napoletano, S., Pinchi, E., Zaami, S., & Fineschi, V. (2015). The impact of nandrolone decanoate on the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, 13(1), 122-131. doi: 10.2174/1570159x13666141210225822
- Calfee, R., & Fadale, P. (2006). Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. *Pediatrics*, 117(3), e577-589. doi: 10.1542/peds.2005-1429
- Catlin, D. H., Kammerer, R. C., Hatton, C. K., Sekera, M. H., & Merdink, J. L. (1987). Analytical chemistry at the Games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles, 1984. *Clin Chem*, 33(2 Pt 1), 319-327.
- Celotti, F., & Negri Cesi, P. (1992). 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*, 43(5), 469-477.
- Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 130(3), 548-562. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.026
- Choi, P. Y., & Pope, H. G., Jr. (1994). Violence toward women and illicit androgenic-anabolic steroid use. *Ann Clin Psychiatry*, 6(1), 21-25.
- Chowdhury, S. R., Djordjevic, J., Albensi, B. C., & Fernyhough, P. (2015). Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci Rep*, 36(1), e00286. doi: 10.1042/bsr20150244
- Clark, A. S., & Harrold, E. V. (1997). Comparison of the effects of stanozolol, oxymetholone, and testosterone cypionate on the sexual behavior of castrated male rats. *Behav Neurosci*, 111(6), 1368-1374.
- Clark, A. S., & Henderson, L. P. (2003). Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(5), 413-436.
- Cohen, J. C., & Hickman, R. (1987). Insulin resistance and diminished glucose tolerance in powerlifters ingesting anabolic steroids. *J Clin Endocrinol Metab*, 64(5), 960-963. doi: 10.1210/jcem-64-5-960
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2-5. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.063
- Dal Pizzol, T. d. S., Branco, M. M. N., Carvalho, R. M. A. d., Pasqualotti, A., Maciel, E. N., & Migott, A. M. B. (2006). Uso não-médico de medicamentos psicoativos entre escolares do ensino fundamental e médio no Sul do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22, 109-115.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65(1), 1-105.
- Demetrius, L. A., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2014). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Front Physiol*, 5, 522. doi: 10.3389/fphys.2014.00522
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., & Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52(4), 513-556.
- Fanaei, H., Karimian, S. M., Sadeghipour, H. R., Hassanzade, G., Kasaeian, A., Attari, F., Javadimehr, M. (2014). Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. *Brain Res*, 1558, 74-83. doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.028

- Feng, D., Wang, W., Dong, Y., Wu, L., Huang, J., Ma, Y., Qin, H. (2014). Ceftriaxone alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by increasing excitatory amino acid transporter 2 expression via the PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway. *Neuroscience*, 268, 21-32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.053
- Ferreira, M., Aguiar, T., & Vilarinho, L. (2008). Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déce do Complexo I. *Arquivos de Medicina*, 22, 49-56.
- Freitas, R. M. (2014). MECANISMO DE AÇÃO, EFEITOS FARMACOLÓGICOS E REAÇÕES ADVERSAS DA CEFTRIAXONA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. 2014, 11(3). doi: 10.5216/ref.v11i3.7424
- Ghanizadeh, A., & Namazi, M. R. (2010). A possible research and clinical implication of association of homocysteine and glutamate levels in brain for management of aggression. *Int J Dev Neurosci*, 28(2), 125. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.01.003
- Glazer, G. (1991). Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. A literature review. *Arch Intern Med*, 151(10), 1925-1933.
- Gneiger, E. (2014). *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis*. (4th ed. ed.). Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications.
- Henderson, L. P., Penatti, C. A., Jones, B. L., Yang, P., & Clark, A. S. (2006). Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. *Neuroscience*, 138(3), 793-799. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.039
- Hershberger, L. G., Shipley, E. G., & Meyer, R. K. (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med*, 83(1), 175-180.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108. doi: 10.1146/annurev.ne.17.030194.000335
- Janssen, P. J., Brinkmann, A. O., Boersma, W. J., & Van der Kwast, T. H. (1994). Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pre-treatment. *J Histochem Cytochem*, 42(8), 1169-1175. doi: 10.1177/42.8.8027537
- Joseph, M. M., CA. . (1986). *Amino acids and small peptides*. Oxford: RL Press.
- Joubert, Y., & Tobin, C. (1989). Satellite cell proliferation and increase in the number of myonuclei induced by testosterone in the levator ani muscle of the adult female rat. *Dev Biol*, 131(2), 550-557.
- Kalinine, E., Zimmer, E. R., Zenki, K. C., Kalinine, I., Kazlauckas, V., Haas, C. B., Portela, L. V. (2014). Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. *Horm Behav*, 66(2), 383-392. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.06.005
- Kam, P. C., & Yarrow, M. (2005). Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*, 60(7), 685-692. doi: 10.1111/j.1365-2044.2005.04218.x
- Kaufman, M. J., Janes, A. C., Hudson, J. I., Brennan, B. P., Kanayama, G., Kerrigan, A. R., Pope, H. G., Jr. (2015). Brain and cognition abnormalities in long-term anabolic-androgenic steroid users. *Drug Alcohol Depend*, 152, 47-56. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.04.023
- Kazlauckas, V., Schuh, J., Dall'Igna, O. P., Pereira, G. S., Bonan, C. D., & Lara, D. R. (2005). Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. *Behav Brain Res*, 162(2), 272-278. doi: 10.1016/j.bbr.2005.03.021

- Kicman, A. T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol*, 154(3), 502-521. doi: 10.1038/bjp.2008.165
- Kicman, A. T., & Brooks, R. V. (1988). A radioimmunoassay for the metabolites of the anabolic steroid nandrolone. *J Pharm Biomed Anal*, 6(5), 473-483.
- Kicman, A. T., & Gower, D. B. (2003). Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem*, 40(Pt 4), 321-356. doi: 10.1258/000456303766476977
- Kochakian, C. (2000). *Anabolic-androgenic steroids: a historical perspective and definition*. Champaign: Human Kinetics.
- Kraguljac, N. V., Frolich, M. A., Tran, S., White, D. M., Nichols, N., Barton-McArdle, A., Lahti, A. C. (2016). Ketamine modulates hippocampal neurochemistry and functional connectivity: a combined magnetic resonance spectroscopy and resting-state fMRI study in healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2016.122
- Kruskemper, H. (1968). *Anabolic steroids*. New York: Academic Press.
- Krzyzanowska, W., Pomierny, B., Budziszewska, B., Filip, M., & Pera, J. (2016). N-Acetylcysteine and Ceftriaxone as Preconditioning Strategies in Focal Brain Ischemia: Influence on Glutamate Transporters Expression. *Neurotoxicity Research*, 29(4), 539-550. doi: 10.1007/s12640-016-9602-z
- Kuhn, C. (2002). *Anabolic steroids*. (Vol. 57). New York.
- Le Greves, P., Huang, W., Johansson, P., Thornwall, M., Zhou, Q., & Nyberg, F. (1997). Effects of an anabolic-androgenic steroid on the regulation of the NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs in brain regions of the male rat. *Neurosci Lett*, 226(1), 61-64.
- Lee, S. G., Su, Z. Z., Emdad, L., Gupta, P., Sarkar, D., Borjabad, A., Fisher, P. B. (2008). Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem*, 283(19), 13116-13123. doi: 10.1074/jbc.M707697200
- Lindqvist, A. S., Johansson-Steensland, P., Nyberg, F., & Fahlke, C. (2002). Anabolic androgenic steroid affects competitive behaviour, behavioural response to ethanol and brain serotonin levels. *Behav Brain Res*, 133(1), 21-29.
- Long, S. F., Wilson, M. C., Sufka, K. J., & Davis, W. M. (1996). The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 20(5), 839-856.
- Lopes, C. A., Moreno, G., & Curi, P. R. (1990). Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcus aureus* isolated from animal and human sources in Brazil. *Br Vet J*, 146(1), 50-56.
- Loughton, S. J., & Ruhling, R. O. (1977). Human strength and endurance responses to anabolic steroid and training. *J Sports Med Phys Fitness*, 17(3), 285-296.
- Lukas, S. E. (1993). Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 14(2), 61-68.
- Lustig, C., Snyder, A. Z., Bhakta, M., O'Brien, K. C., McAvoy, M., Raichle, M. E., Buckner, R. L. (2003). Functional deactivations: Change with age and dementia of the Alzheimer type. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14504-14509. doi: 10.1073/pnas.2235925100
- Ma, F., & Liu, D. (2015). 17beta-trenbolone, an anabolic-androgenic steroid as well as an environmental hormone, contributes to neurodegeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 282(1), 68-76. doi: 10.1016/j.taap.2014.11.007

- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2004). Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis*, *15*(3), 461-473. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.007
- Maravelias, C., Dona, A., Stefanidou, M., & Spiliopoulou, C. (2005). Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett*, *158*(3), 167-175. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.06.005
- Martinez-Lozada, Z., & Ortega, A. (2015). Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural Plast*, *2015*, 787396. doi: 10.1155/2015/787396
- Martinez-Sanchis, S., Aragon, C. M., & Salvador, A. (2002). Cocaine-induced locomotor activity is enhanced by exogenous testosterone. *Physiol Behav*, *76*(4-5), 605-609.
- Martini, L. (1982). The 5alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocr Rev*, *3*(1), 1-25. doi: 10.1210/edrv-3-1-1
- Matsumine, H., Hirato, K., Yanaihara, T., Tamada, T., & Yoshida, M. (1986). Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*, *63*(3), 717-720. doi: 10.1210/jcem-63-3-717
- McGinnis, M. Y. (2004). Anabolic androgenic steroids and aggression: studies using animal models. *Ann N Y Acad Sci*, *1036*, 399-415. doi: 10.1196/annals.1330.024
- Miladinovic, T., Nashed, M. G., & Singh, G. (2015). Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. *Biomolecules*, *5*(4), 3112-3141. doi: 10.3390/biom5043112
- Minkin, D. M., Meyer, M. E., & van Haaren, F. (1993). Behavioral effects of long-term administration of an anabolic steroid in intact and castrated male Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *44*(4), 959-963.
- Miyamoto, H., Yeh, S., Lardy, H., Messing, E., & Chang, C. (1998). Delta5-androstenediol is a natural hormone with androgenic activity in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(19), 11083-11088.
- Mooradian, A. D., Morley, J. E., & Korenman, S. G. (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev*, *8*(1), 1-28. doi: 10.1210/edrv-8-1-1
- Morrison, T. R., Sikes, R. W., & Melloni, R. H., Jr. (2016). Anabolic steroids alter the physiological activity of aggression circuits in the lateral anterior hypothalamus. *Neuroscience*, *315*, 1-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.001
- Muller, A. P., Gnoatto, J., Moreira, J. D., Zimmer, E. R., Haas, C. B., Lulhier, F., Portela, L. V. (2011). Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus*, *21*(10), 1082-1092. doi: 10.1002/hipo.20822
- Muller, A. P., Haas, C. B., Camacho-Pereira, J., Brochier, A. W., Gnoatto, J., Zimmer, E. R., Portela, L. V. (2013). Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. *Exp Neurol*, *247*, 66-72. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.03.007
- Nguyen, T. V., Jayaraman, A., Quaglino, A., & Pike, C. J. (2010). Androgens selectively protect against apoptosis in hippocampal neurones. *J Neuroendocrinol*, *22*(9), 1013-1022. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02044.x
- Nicholls, D. G. (2003). Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem Res*, *28*(10), 1433-1441.
- Nicholls, D. G. (2010). Stochastic aspects of transmitter release and bioenergetic dysfunction in isolated nerve terminals. *Biochem Soc Trans*, *38*(2), 457-459. doi: 10.1042/bst0380457

- Oberlander, J. G., & Henderson, L. P. (2012). Corticotropin-Releasing Factor Modulation of Forebrain GABAergic Transmission has a Pivotal Role in the Expression of Anabolic Steroid-Induced Anxiety in the Female Mouse. *Neuropsychopharmacology*, *37*(6), 1483-1499. doi: 10.1038/npp.2011.334
- Parrott, A. C., Choi, P. Y., & Davies, M. (1994). Anabolic steroid use by amateur athletes: effects upon psychological mood states. *J Sports Med Phys Fitness*, *34*(3), 292-298.
- Peng, T. I., Jou, M. J., Sheu, S. S., & Greenamyre, J. T. (1998). Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp Neurol*, *149*(1), 1-12. doi: 10.1006/exnr.1997.6599
- Pope, H. G., Jr., & Katz, D. L. (1988). Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry*, *145*(4), 487-490. doi: 10.1176/ajp.145.4.487
- Pope, H. G., Jr., & Katz, D. L. (1990). Homicide and near-homicide by anabolic steroid users. *J Clin Psychiatry*, *51*(1), 28-31.
- Portela, L. V., Brochier, A. W., Haas, C. B., de Carvalho, A. K., Gnoato, J. A., Zimmer, E. R., .Muller, A. P. (2016). Hyperpalatable Diet and Physical Exercise Modulate the Expression of the Glial Monocarboxylate Transporters MCT1 and 4. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0119-5
- Prentice, H., Modi, J. P., & Wu, J.-Y. (2015). Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 964518. doi: 10.1155/2015/964518
- Reddy, P. H. (2009). Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS Spectr*, *14*(8 Suppl 7), 8-13; discussion 16-18.
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev*, *49*(3), 618-632. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.03.004
- Ribeiro, F. M., Vieira, L. B., Pires, R. G., Olmo, R. P., & Ferguson, S. S. (2017). Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*, *115*, 179-191. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.013
- Romano, A., Gueant-Rodriguez, R. M., Viola, M., Pettinato, R., & Gueant, J. L. (2004). Cross-reactivity and tolerability of cephalosporins in patients with immediate hypersensitivity to penicillins. *Ann Intern Med*, *141*(1), 16-22.
- Romano, A., Mayorga, C., Torres, M. J., Artesani, M. C., Suau, R., Sanchez, F., Blanca, M. (2000). Immediate allergic reactions to cephalosporins: cross-reactivity and selective responses. *J Allergy Clin Immunol*, *106*(6), 1177-1183.
- Roszbach, U. L., Steensland, P., Nyberg, F., & Le Greves, P. (2007). Nandrolone-induced hippocampal phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs. *Biochem Biophys Res Commun*, *357*(4), 1028-1033. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.037
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, *16*(3), 675-686.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Kuncl, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, *13*(3), 713-725.

- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Fisher, P. B. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021), 73-77. doi: 10.1038/nature03180
- Saleh, G. A., El-Shaboury, S. R., Mohamed, F. A., & Rageh, A. H. (2009). Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 73(5), 946-954. doi: 10.1016/j.saa.2009.05.002
- Salem, H., & Saleh, G. A. (2002). Selective spectrophotometric determination of phenolic beta-lactam antibiotics. *J Pharm Biomed Anal*, 28(6), 1205-1213.
- Scaduto, R. C., Jr., & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*, 76(1 Pt 1), 469-477. doi: 10.1016/s0006-3495(99)77214-0
- Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci*, 123(Pt 15), 2533-2542. doi: 10.1242/jcs.070490
- Shahidi, N. T. (2001). A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther*, 23(9), 1355-1390.
- Shank, R. P., & Campbell, G. L. (1984). Glutamine, glutamate, and other possible regulators of alpha-ketoglutarate and malate uptake by synaptic terminals. *J Neurochem*, 42(4), 1162-1169.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Snyder, P. J. (1984). Clinical use of androgens. *Annu Rev Med*, 35, 207-217. doi: 10.1146/annurev.me.35.020184.001231
- Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., & Baracca, A. (2007). Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci Rep*, 27(1-3), 11-21. doi: 10.1007/s10540-007-9033-4
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193-203. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009
- Su, T. P., Pagliaro, M., Schmidt, P. J., Pickar, D., Wolkowitz, O., & Rubinow, D. R. (1993). Neuropsychiatric effects of anabolic steroids in male normal volunteers. *JAMA*, 269(21), 2760-2764.
- Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Meyuhas, O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 21(24), 8671-8683. doi: 10.1128/mcb.21.24.8671-8683.2001
- Todd, T. (1987). Anabolic steroids: the gremlins of sport. *J Sport Hist*, 14(1), 87-107.
- Toth, M., & Zakar, T. (1982). Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 alpha-reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: a suggested role of 5 alpha-reductive steroid metabolism in the dissociation of "myotropic" and "androgenic" activities of 19-nortestosterone. *J Steroid Biochem*, 17(6), 653-660.
- van der Vies, J. (1993). Pharmacokinetics of anabolic steroids. *Wien Med Wochenschr*, 143(14-15), 366-368.
- Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J., Koh, T. W., Zhou, Y., & Bellen, H. J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at

- Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron*, 47(3), 365-378. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.018
- Wagner, J. C. (1991). Enhancement of athletic performance with drugs. An overview. *Sports Med*, 12(4), 250-265.
- Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Wang, J. H., & Lu, Y. (2003). Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 6(10), 1039-1047. doi: 10.1038/nn1119
- Westlye, L. T., Kaufmann, T., Alnaes, D., Hullstein, I. R., & Bjornebekk, A. (2017). Brain connectivity aberrations in anabolic-androgenic steroid users. *Neuroimage Clin*, 13, 62-69. doi: 10.1016/j.nicl.2016.11.014
- Wilson, J. D. (1988). Androgen abuse by athletes. *Endocr Rev*, 9(2), 181-199. doi: 10.1210/edrv-9-2-181
- Wood, R. I. (2006). Anabolic steroids: a fatal attraction? *J Neuroendocrinol*, 18(3), 227-228. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01407.x
- Woolley, J. D., Khan, B. K., Murthy, N. K., Miller, B. L., & Rankin, K. P. (2011). The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease: rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *J Clin Psychiatry*, 72(2), 126-133. doi: 10.4088/JCP.10m06382oli