

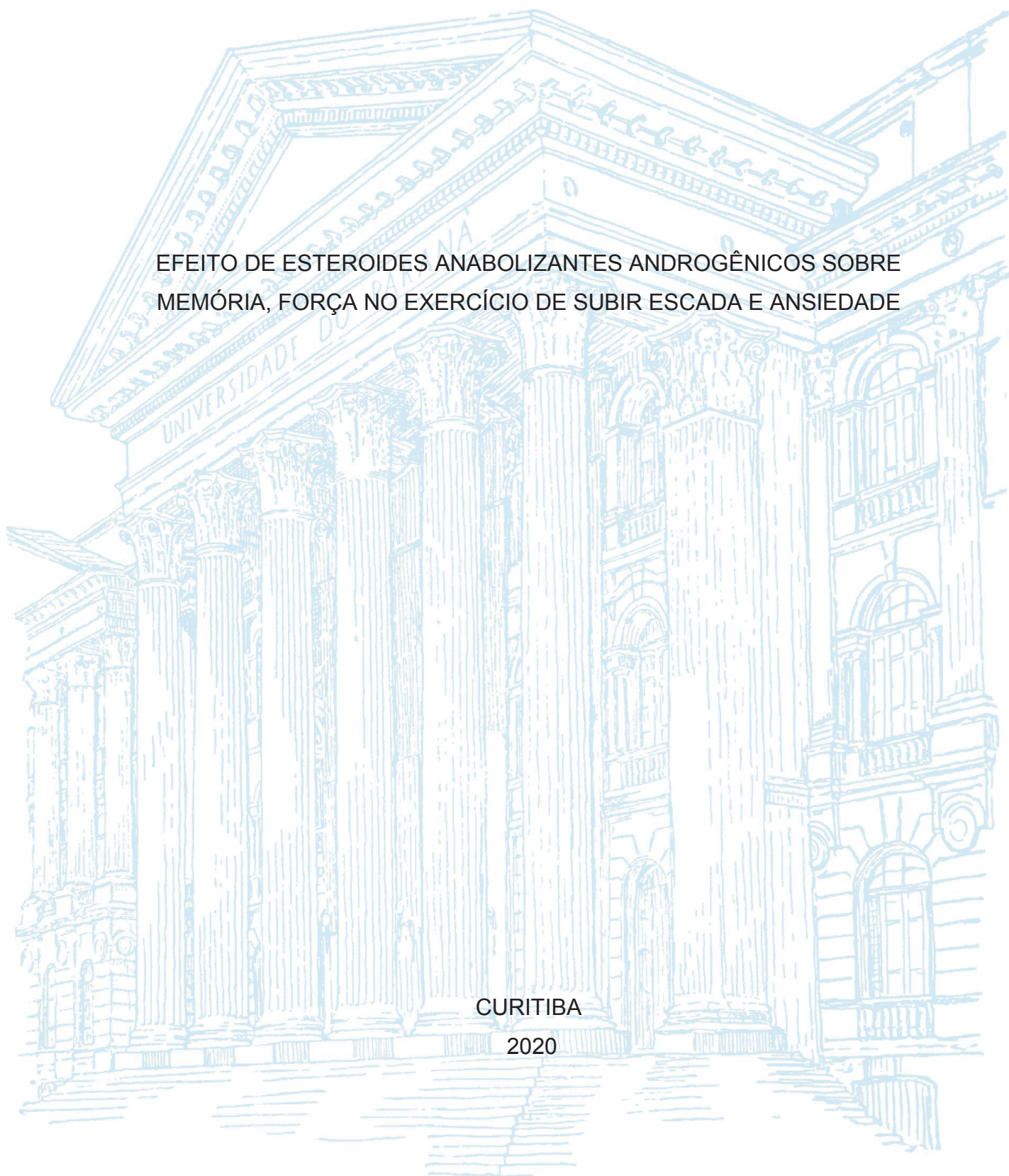
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIOGO DE PAIVA PALUMBO

EFEITO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS SOBRE
MEMÓRIA, FORÇA NO EXERCÍCIO DE SUBIR ESCADA E ANSIEDADE

CURITIBA

2020



DIOGO DE PAIVA PALUMBO

EFEITO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS SOBRE
MEMÓRIA, FORÇA NO EXERCÍCIO DE SUBIR ESCADA E ANSIEDADE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Educação Física, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Raul Osiecki
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Palumbo, Diogo de Paiva
Efeito de esteroides anabolizantes androgênicos sobre
memória, força no exercício de subir escada e ansiedade. /
Diogo de Paiva Palumbo. – Curitiba, 2020.
86 p.: il.

Orientador: Raul Osiecki
Coorientador: Carlos Fernando de Mello

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Educação Física.

1. Esteroides anabólicos. 2. Decanoato de nandrolona. 3.
Memória. 4. Ansiedade. 5. Força muscular. I. Título II.
Osiecki, Raul, 1965-. III. Mello, Carlos Fernando de. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação
Física.

CDD (22. ed.) 572.579



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EDUCAÇÃO FÍSICA -
40001016047P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em EDUCAÇÃO FÍSICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DIOGO DE PAIVA PALUMBO**, intitulada: "**EFEITO DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS SOBRE MEMÓRIA, FORÇA NO EXERCÍCIO DE SUBIR ESCADA E ANSIEDADE**", sob orientação do Prof. Dr. RAUL OSIECKI, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2020.

RAUL OSIECKI

Presidente da Banca Examinadora

CARLOS FERNANDO DE MELLO

Coordenador - Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

PAULO CESAR BARAUCE BENTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Aos meus pais Paulo Afonso Palumbo e Ligia Maria de Paiva Palumbo, que foram os melhores mestres que eu poderia ter, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sempre tive em minha casa pessoas incríveis que me inspiraram a buscar o melhor que eu poderia ser. Meus pais sempre foram figuras admiradoras que me ensinaram valores mais importante que qualquer conhecimento que eu possa adquirir em todos meus futuros anos de estudo. Se cheguei até aqui, foi por muito amor, dedicação e trabalho pelo qual puderam me proporcionar fazer um curso de graduação e pós-graduação a novecentos quilômetros de minha terra natal. Agradeço a vocês meus pais, por me ensinarem o trabalho, dedicação, humildade, honestidade e tantos outros valores que terei para a minha vida inteira. Meus agradecimentos Paulo Afonso e Ligia Maria, eu amo muito vocês!

Agradeço ao meu orientador Raul Osiecki por todas as conversas sobre fisiologia ao final das aulas de graduação e por toda atenção recebida ao expor minhas ideias, o qual foi determinante pelo meu interesse pela ciência. Muito obrigado pela oportunidade que me deu de poder ingressar na pós-graduação e contribuir pela pesquisa dentro de seu grupo de pesquisa, e por fim e não menos importante, muito obrigado por ter confiado no meu potencial bem como ter me indicado para poder fazer a parceria com o professor Carlos Mello.

Agradeço imensamente meu coorientador, amigo e praticamente segundo pai, Carlos Fernando de Mello, você quem me ensinou a fazer ciência, me ensinou a realizar os questionamentos corretos, me ensinou a ter pensamento crítico científico e até virar um chato da metodologia. Obrigado por todo imenso apoio ao meu crescimento científico que você me proporcionou, e se não bastasse isto, ainda é pequeno em comparação a todas as outras coisas que eu preciso agradecer a você. Agradeço imensamente por toda a parceria, carinho e imensa amizade. Penso eu que você é uma das pessoas muito especiais que a vida coloca no nosso caminho para podermos aprender imensamente. E eu só tenho que agradecer a vida por ter me proporcionado uma pessoa como você no meu caminho, um coorientador que virou meu grande amigo e até meu segundo pai em Santa Maria. Sou eternamente grato pela oportunidade, pela segunda família em Santa Maria, amizade e noites vendo filmes e tomando vinho. Dando risadas e falando bobagens junto a um pouco de ciência.

Agradeço a todos meus amigos que o CEPEFIS me deu, todos foram determinantes na minha trajetória como mestrando, meus agradecimentos ao Alysson

Enes, meu amigo e companheiro de empreitada de início de laboratório. Ao Danilo Leonel Alves, amigo que tanto me ajudou nesse caminho de mestrado, por todos textos corrigidos, dúvidas tiradas, muito do que eu evoluo eu devo a você. Meus agradecimentos ao José Moiano e Gustavo Oneda por toda amizade e parceria que sei que vou levar para o resto da vida. E claro, todos os outros integrantes do CEPEFIS os quais puderam me acompanhar nestes dois anos.

Meus agradecimentos aos integrantes do LabNeuro, Felipe, Fernanda e Micheli, os quais me receberam de muito carinho e sempre me ajudaram em todos meus meses por Santa Maria. E claro, principalmente a Bruna Girardi por toda a amizade feita, por todas correções realizadas, por toda ajuda que me proporcionou. Tenha certeza de que você tem uma grande parcela em todo meu trabalho realizado até aqui, sou muito grato por tudo que me ajudou.

Agradeço ao professor Adair Roberto Soares dos Santos do programa de pós-graduação em Neurociências por deixar que parte dos experimentos deste trabalho fossem conduzidos em seu laboratório na UFSC.

Agradeço a meu professor de biologia do ensino médio, Dinho, o qual despertou-me o interesse pela área biológica, principalmente fisiologia e neurologia. Obrigado pelas conversas sobre os temas supracitados e aulas incríveis as quais me despertaram a curiosidade de estudar sempre mais, e isto me ajudou a chegar até a este trabalho de dissertação. Fico imensamente agradecido por todos quilômetros viajados longe de casa, conheci pessoas incríveis, vivi histórias extraordinárias desde que saí de Minas Gerais, sou grato por todas pessoas que me ajudaram a vive-las.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A ciência não se faz sozinha”

(I. Tessele)

Penso que por isso tive tantas pessoas incríveis que
me ajudaram a chegar até aqui...

RESUMO

A decanoato de nandrolona (DN) é um hormônio derivado da testosterona e seus derivados. Além disto, estudos mostram que a administração de DN pode prejudicar tarefas de memória em roedores e sobrevivência neuronal em cultura de células nervosas. Entretanto, o mecanismo com que a DN pode induzir estes efeitos deletérios permanece desconhecido. Por esta razão o objetivo do nosso trabalho foi investigar o efeito da administração prolongada DN sobre a memória, além de investigar o envolvimento do receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) no efeito deletério induzido pelo DN. Para tal, foram utilizados camundongos Swiss machos de 25-35gr os quais foram administrados de forma prolongada durante 19 dias com DN (5, 15 ou 50 mg/kg, s.c.) foi verificada a performance no teste de memória de reconhecimento de objetos, parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevada, alterações na atividade locomotora no teste de campo aberto e, por fim, alterações na força muscular no aparato de subida de escada. Para verificar o envolvimento do receptor NMDA, subunidade GluN2B, no efeito induzido pela DN, foram utilizados moduladores alostéricos positivos e negativos (espermina e ifenprodil, respectivamente). As variáveis supracitadas foram analisadas por ANOVA de uma, duas ou três vias conforme necessário. Nossos resultados mostram que a administração de DN (5 e 15 mg/kg s.c.) apresentou prejuízo na performance do teste de reconhecimento de objetos. Este efeito foi prevenido com a administração de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.), sugerindo um papel das subunidades GluN2B nos prejuízos induzidos pela DN. A administração de espermina reverteu parcialmente tais efeitos, sendo possível especular que o sistema poliaminérgico tenha um papel nos prejuízos de memória da administração prolongada de DN. A administração de DN apresenta efeito ansiogênico (50 mg/kg s.c.). A atividade locomotora dos animais não sofreu alterações com todos os tratamentos farmacológicos utilizados, e por fim, a decanoato de nandrolona não altera a força máxima e massa corporal de camundongos. Em conclusão, a administração prolongada de DN causa prejuízos de memória e ansiedade, e há participação das subunidades GluN2B, dos receptores NMDA, nos prejuízos de memória. A administração prolongada de DN não alterou a força e massa corporal de camundongos.

Palavras-chave: decanoato de nandrolona, memória, receptor n-metil-d-aspartato.

ABSTRACT

Nandrolone decanoate (ND) is a hormone derived from testosterone and its derivatives. Moreover, studies show that ND administration can impair memory tasks in rodents and neuronal survival in cultured neurons. However, the mechanism underlying ND-deleterious effects remains not understood. For this reason, the aim of our study was to investigate the effect of prolonged ND administration on memory, in addition to investigating the involvement of the N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor in the ND-deleterious effect on memory. For this, male Swiss mice of 25-35 grams, were used. They were prolonged administered for 19 days with ND (5, 15 or 50 mg/kg, s.c.) and performance on object recognition test was verified, anxiety parameters in the elevated plus maze, changes in locomotor activity in the open field test and, finally, changes in muscle strength in the ladder climbing apparatus. The involvement of the GluN2B subunit, of NMDA receptor, on ND-induced deleterious effects on memory was verified using positive and negative allosteric modulators (spermine and ifenprodil, respectively). The variables described were analyzed using one, two or three-way ANOVA as needed. Our results show that ND administration impairs performance on object recognition test (5 and 15 mg/kg s.c.). This effect was prevented with the administration of ifenprodil (0.3 mg/kg i.p.), suggesting a role for the GluN2B subunits on ND-induced impairment. The administration of spermine partially reversed these effects, and it is possible to hypothesize that the polyamine system plays a role in the memory impairment of prolonged ND administration. The administration of ND has an anxiogenic effect (50 mg / kg s.c.). The locomotor activity of the animals did not change with all pharmacological treatments used, and finally, nandrolone decanoate did not change the maximum strength and body mass of mice. In conclusion, prolonged administration of ND induces memory impairment and anxiety, and GluN2B subunits of NMDA receptors play a role in memory impairment. The prolonged administration of ND did not alter the maximal strength and body mass of mice.

Keywords: nandrolone decanoate, n-methyl-d-aspartate receptor, memory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos mecanismos de ação e hipóteses desta dissertação.....	03
Figura 2. Estrutura molecular da testosterona.....	06
Figura 3. Organização estrutural do gene e proteína do receptor androgênico.	10
Figura 4. Vias de sinalização compreendendo os efeitos anabólicos dos esteroides anabolizantes androgênicos.....	11
Figura 5. Estrutura molecular da decanoato de nandrolona.....	14
Figura 6. Estrutura do receptor N-metil-D-Aspartato.	18
Figura 7. Estrutura química das poliaminas.	24
Figura 8. Sítios de modulação alostérica no NMDAr.....	26
Figura 9. Desenho experimental.	33
Figura 10. Administração prolongada de decanoato de nandrolona prejudica a performance no teste de memória de reconhecimento de objetos.....	38
Figura 11. Administração prolongada de ifenprodil previne o prejuízo de memória induzido por decanoato de nandrolona no teste de memória de reconhecimento de objetos.	39
Figura 12. Espermina reverte a prevenção de memória induzida pela coadministração prolongada de ifenprodil e decanoato de nandrolona no teste de memória de reconhecimento de objetos novos.	40
Figura 13. Administração prolongada de decanoato de nandrolona altera a ansiedade de animais no labirinto em cruz elevado.....	41
Figura 14. Administração prolongada de decanoato de nandrolona e ifenprodil não altera a ansiedade de camundongos no labirinto em cruz elevado elevado	43
Figura 15. Administração prolongada de decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a ansiedade de camundongos no labirinto em cruz elevado.....	45
Figura 16. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto.	46
Figura 17. Administração prolongada de decanoato de nandrolona e/ou ifenprodil não alteram a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto.....	47

Figura 18. Administração prolongada de decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a atividade locomotora de camundongos no teste de campo aberto.	48
Figura 19. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a força máxima de camundongos no aparato de subida de escada.	49
Figura 20. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a massa corporal de camundongos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EAA – Esteroides anabolizantes androgênicos

RA – Receptor Androgênico

ERA – Elemento de resposta androgênica

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

AKT - Proteína quinase B

NMDA - N-metil-D-Aspartato

GABA - Gama-aminobutírico

SNC – Sistema nervoso central

DN – Decanoato de nandrolona

FCE - Fator de crescimento epidérmico

NMDAr – Receptores N-metil-D-Aspartato

PA - Poliaminas

NTD - Domínio N-terminal

LBD – Domínio de ligação ao ligante

DBD – Domínio de ligação ao DNA

PLD – Potencialização de longa duração

DLD – Depressão de longa duração

CaMKII - Proteína quinase dependente de cálcio II

PKA - Proteínas quinases como proteína quinase dependente de cAMP

PKC - Proteína quinase C

CREB - Elemento de resposta ao cAMP

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

s.c. – Subcutânea

i.p. – Intraperitoneal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	5
1.2 OBJETIVOS	6
1.3 OBJETIVO GERAL	6
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS (EAA)	7
2.1.1 EAA: MECANISMOS DE AÇÃO	9
2.1.2 EAA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	14
2.1.3 EAA E MEMÓRIA	16
2.2 MEMÓRIA DECLARATIVA	17
2.3 RECEPTORES N-METIL-D-ASPARTATO	18
2.3.1 NMDAR E MEMÓRIA	21
2.3.2 NMDAR E EXCITOTOXIDADE	24
2.4 POLIAMINAS	25
2.4.1 POLIAMINAS E RECEPTORES NMDA	27
2.4.2 POLIAMINAS E EXCITOTOXIDADE	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 ANIMAIS	30
3.2 DROGAS	30
3.3 MODELO EXPERIMENTAL	32
3.3.1 Tarefa de reconhecimento de objetos novos	32
3.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado	33
3.3.3 Subida de escada	34
3.3.4 Teste de campo aberto	35
3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
3.4.1 Efeito da administração prolongada de decanoato de nandrolona sobre a performance no teste de memória de reconhecimento de objeto	36
3.4.2 Envolvimento do receptor NMDA no efeito induzido pelo decanoato de nandrolona na performance no teste de memória de reconhecimento de objeto	37

3.4.3 Efeito da coadministração de espermina e ifenprodil sobre o efeito induzido pelo decanoato de nandrolona na performance no teste de memória de reconhecimento de objeto	37
3.4.4 Efeito da administração de decanoato de nandrolona sobre parâmetros de ansiedade.....	38
3.4.5 Efeito da administração de decanoato de nandrolona na atividade locomotora	38
3.4.6 Efeito da administração de decanoato de nandrolona sobre a força máxima ..	38
3.4.7 Efeito administração de decanoato de nandrolona sobre a massa corporal	39
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 DECANOATO DE NANDROLONA PREJUDICA A PERFORMANCE NO TESTE DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NOVOS.	41
4.2 IFENPRODIL PREVINE O PREJUÍZO DE MEMÓRIA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE DECANOATO DE NANDROLONA.....	42
4.3 ESPERMINA REVERTE PARCIALMENTE O EFEITO PROTETOR DO IFENPRODIL.....	43
4.4 DECANOATO DE NANDROLONA ALTERA A ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	44
4.5 DECANOATO DE NANDROLONA E IFENPRODIL NÃO ALTERAM A ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS.....	46
4.6 DECANOATO DE NANDROLONA, IFENPRODIL E ESPERMINA NÃO ALTERAM A ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS	48
4.7 DECANOATO DE NANDROLONA NÃO ALTERA A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS	50
4.8 DECANOATO DE NANDROLONA E IFENPRODIL NÃO ALTERAM A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS.....	51
4.9 DECANOATO DE NANDROLONA, IFENPRODIL E ESPERMINA NÃO ALTERAM A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE CAMUNDONGOS	52
4.10 DECANOATO DE NANDROLONA NÃO ALTERA A FORÇA MÁXIMA DE CAMUNDONGOS	53
4.11 DECANOATO DE NANDROLONA NÃO ALTERA A MASSA CORPORAL DE CAMUNDONGOS	54
5 DISCUSSÃO	55

6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são hormônios lipofílicos derivados da testosterona, que podem contribuir para o crescimento muscular e masculinização, chamados de efeitos anabólicos e androgênicos (ELFVERSON *et al.*, 2011). Fisiculturistas e atletas têm utilizado EAA com a finalidade de aumento de massa muscular com propósitos de competição (KOURI *et al.*, 1995). Dentre o vasto número de EAA existente, a decanoato de nandrolona (DN) derivada da 19-nortestosterona, é um dos mais utilizados no mundo (EKLÖF *et al.*, 2003; PERRY; ANDERSEN; YATES, 1990; VERROKEN, 2001). Além disto, aplicações clínicas para a prescrição de EAA, especialmente DN, tem sido recentemente revisadas (WU; KOVAC, 2016), se incluindo doenças com catabolismo crônico, hipogonadismo masculino e alopecia androgênica. Entretanto, tem sido reportado efeitos deletérios relacionados ao uso prolongado de doses supra fisiológicas de DN no sistema nervoso central (SNC), incluindo aumento no tamanho e redução na conectividade funcional da amígdala em humanos (KAUFMAN *et al.*, 2015), e prejuízo de memória visuoespacial (KANAYAMA *et al.*, 2013). Evidências experimentais mostram que tanto a administração aguda, quanto crônica de DN causam efeitos deletérios no SNC de roedores e cultura de neurônios. De fato, tem sido mostrado que DN causa efeitos deletérios no aprendizado e memória, bem como apresenta efeito ansiogênico (JOKSIMOVIC *et al.*, 2019; KARAMIAN *et al.*, 2014; KOUVELAS *et al.*, 2008; MAGNUSSON *et al.*, 2009; MORADPOUR *et al.*, 2019; ROSIC *et al.*, 2014; SELAKOVIC *et al.*, 2017; ZAREI *et al.*, 2018); e prejudica a sobrevivência neuronal, desencadeando eventos neurotóxicos (BRÄNNVALL *et al.*, 2005; CARACI *et al.*, 2011; ORLANDO *et al.*, 2007).

Os mecanismos subjacentes ao prejuízo de memória induzido pela DN ainda não estão bem descritos na literatura. Nesse sentido, a DN é um agonista do receptor androgênico (GAO; BOHL; DALTON, 2005). De fato, a DN facilita a transcrição (SHANG; MYERS; BROWN, 2002), e posteriormente permite a ativação da expressão gênica regulada por tal receptor (GAO; BOHL; DALTON, 2005), desencadeando seus efeitos anabólicos e androgênicos. Tem sido mostrado que DN é um agonista do sítio de ligação dos neuroesteroides nos receptores sigma-1 (ELFVERSON *et al.*, 2011). Os receptores sigma-1 são proteínas associadas à membrana celular (SCHMIDT *et al.*, 2016), possuem atividade tipo chaperona (HAYASHI; SU, 2005), e podem facilitar

a ativação de receptores N-metil-D-Aspartato (NMDAr) (PABBA; SIBILLE, 2015). Nesse sentido, tem sido sugerido que a administração aguda de DN pode facilitar a transmissão glutamatérgica mediada pelos NMDAr (ROSSBACH *et al.*, 2007), bem como de forma prolongada pode aumentar os níveis de glutamato através da diminuição de seu transportador GLT-1 (KALININE *et al.*, 2014). Um excessivo influxo de Ca^{2+} , mediados via NMDAr, pode desencadear a ativação de vias de sinalização dependentes de cálcio, que estão envolvidas em efeitos neurotóxicos, incluindo prejuízo de memória e aprendizado (TRINCHESE *et al.*, 2008; VOSLER; BRENNAN; CHEN, 2008). Interessantemente, evidências mostram que o prejuízo de memória e perda sináptica em contextos neurotóxicos é mediado via ativação anormal dos NMDAr (KAMENETZ *et al.*, 2003; LO; GROSSBERG, 2011; SABATINI *et al.*, 2007). Portanto, é possível que o prejuízo da memória induzido pela administração prolongada de DN seja mediado via NMDAr.

As poliaminas são aminas alifáticas (GUGLIUCCI, 2004) que possuem carga positiva no pH fisiológico, e estão presentes em altas concentrações no SNC (CARTER, 1994; MORRISON *et al.*, 1995). Evidências eletrofisiológicas e neuroquímicas mostram que as poliaminas podem modular os NMDAr (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MONY *et al.*, 2009, 2011; ROCK; MACDONALD, 1992; SHIMADA *et al.*, 1994; WILLIAMS, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1991). Além disto, as poliaminas facilitam a ligação do glutamato nos NMDAr, a partir da estabilização do lobo inferior do domínio N-terminal (NTD) do receptor, atuando nas interfaces dos dímeros GluN1/GluN2B (MONY *et al.*, 2011). De fato, tem sido mostrado que as administrações sistêmica (CAMERA *et al.*, 2007), intrahipocampal, e intra-amígdala (RUBIN *et al.*, 2001, 2004) podem melhorar a memória de roedores em diferentes tarefas. No entanto, foi sugerido que, enquanto a administração de PA aumenta, a inibição do sistema poliaminérgico atenua o déficit de memória induzida pela superativação de NMDAr (GOMES *et al.*, 2014). Portanto, se o prejuízo de memória induzido pela DN é devido à excessiva ativação de NMDAr, é possível que moduladores negativos destes receptores, especialmente ifenprodil, possam ser utilizados para atenuar tais déficits. Apesar de ser conhecido o efeito deletério do DN sobre tarefas de memória, não está claro se estes efeitos estão relacionados à ativação excessiva de GluN2B. Assim, esse trabalho investigará se ifenprodil, um antagonista seletivo da subunidade GluN2B, previne o déficit na performance do teste de reconhecimento de objetos induzido pela administração de DN.

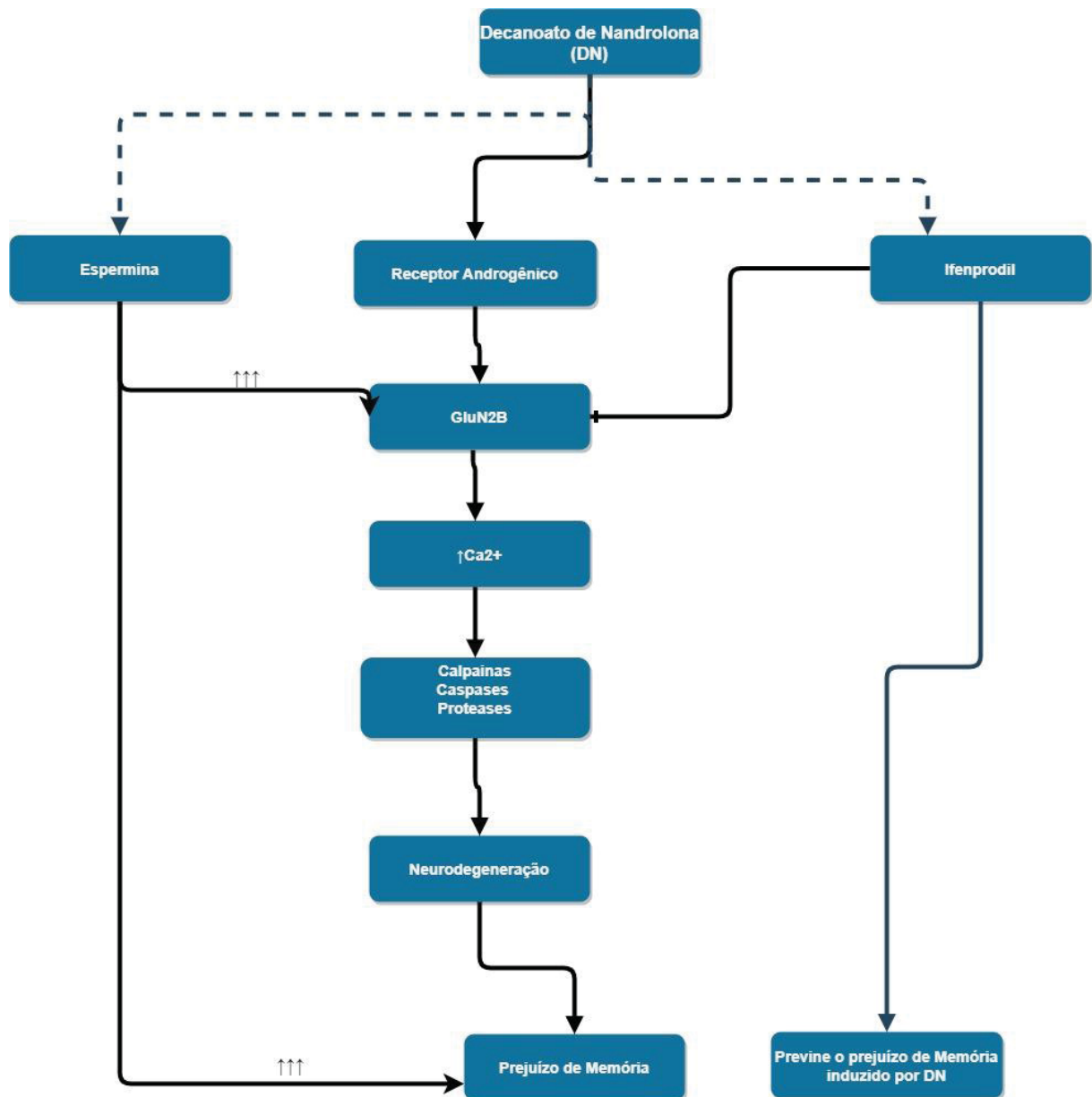


Figura 1. Fluxograma dos mecanismos de ação e hipóteses desta dissertação. Administração prolongada de DN e/ou ifenprodil e/ou espermina e possíveis desfechos. DN de forma prolongada pode aumentar a ativação de NMDAR que contém as subunidades GluN2B, sendo possível que seja mediado via receptor androgênico. Este aumento excessivo na transmissão glutamatérgica mediada NMDA pode desencadear um influxo anormal de Ca^{2+} , que por sua vez recrutam calpains, caspases e proteases envolvidas em eventos neurodegenerativos. Por fim, tem sido mostrado que eventos neurotóxicos podem ativar proteínas dependentes de cálcio e degradar enzimas quinases envolvidas nos processos de aprendizado e memória. É possível hipotetizar que antagonizando os NMDA com um

modulador alostérico negativo, ifenprodil, diminua toda a cascata neurotóxica induzida pela administração prolongada de DN e, conseqüentemente, previna o efeito deletério na memória. Da mesma forma, é possível que a administração de espermina, por facilitar novamente a ativação de NMDAR, reverta o efeito protetor realizado pelo ifenprodil.

1.1 JUSTIFICATIVA

A decanoato de nandrolona (DN) é o um dos esteroides anabolizantes androgênicos mais populares no mundo (Bahrke et al., 2000; Kopera, 1985; Eklöf, Thurelius, Garle, Rane, & Sjöqvist, 2003; Verroken, 2001). Revisões recentes sugerem que a administração deste medicamento tem potencial terapêutico em patologias como: hipogonadismo, alopecia androgênica e catabolismo crônico (Wu & Kovac, 2016). No entanto, em 1997, estimava-se que 4-12% de jovens escolares faziam uso de esteroides anabolizantes androgênicos, especialmente DN (Anderson et al., 1997) de forma recreativa e ilegal. Além disto, este trabalho possui relevância na área de saúde pública, pois há um aumento no comércio de esteroides anabolizantes como a testosterona, DN e estanozolol (McGannis, 2004) no Brasil para fins não-terapêuticos (Evans, 2004). Tem sido mostrado que uma boa parte dos utilizadores de EAA são jovens adolescentes, atletas amadores e mulheres que buscam nos esteroides anabolizantes o fator para aumentar o desempenho na performance física (GORINI *et al.*, 2015). Adicionalmente, os esteroides anabolizantes, como por exemplo o DN, podem induzir efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal (Kanayama et al., 2012). Estes, afetam sistema nervoso central, causando prejuízo de memória, aumento da ansiedade e agressividade (Karamian et al., 2013; Kouvelas et al., 2008; Magnusson et al., 2009; Fatemeh et al., 2017; Busardò et al., 2015; Caraci et al., 2011; Orlando et al., 2007; Ma & Liu, 2015). Neste sentido, torna-se importante caracterizar os efeitos neurotóxicos e comportamentais decorrentes da administração prolongada de DN. Além disto, se faz necessário investigar os mecanismos por trás destes efeitos deletérios, uma vez que tal conhecimento, repensar a utilização por parte de DN devido aos efeitos possíveis deletérios apresentados neste trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.3 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da administração prolongada DN sobre a memória, ansiedade e força muscular. Além de investigar o envolvimento do receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) no efeito deletério induzido pelo DN.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar se a administração prolongada, durante 19 dias, de DN altera a memória no teste de reconhecimento de objetos em camundongos.
- 2- Avaliar o envolvimento das subunidades GluN2B, do receptor NMDA, sobre o efeito da DN na performance do teste reconhecimento de objetos, através da administração de um antagonista da subunidade GluN2B, ifenprodil.
- 3- Avaliar o envolvimento da subunidade GluN2B, do receptor NMDA, sobre o efeito deletério do DN na performance do teste reconhecimento de objetos, através da coadministração de um modulador alostérico positivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA, espermina.
- 4- Avaliar se a administração prolongada de DN altera parâmetros de ansiedade de animais no labirinto em cruz elevado.
- 5- Avaliar se a administração prolongada de DN altera a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto.
- 6- Avaliar o efeito da administração prolongada, durante 19 dias, de DN, sobre a força muscular de camundongos
- 7- Avaliar o efeito da administração prolongada, durante 19 dias, de DN, sobre a massa corporal de camundongos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS (EAA)

Em 1935, o descobrimento do processo para se sintetizar a testosterona (Figura 2) a partir do colesterol foi capaz de acelerar as investigações científicas sobre os efeitos destes andrógenos (RUZICKA; WETTSTEIN; KAEGI, 1935). Por volta de 1945, devido às características de aumento na performance induzida pelos EAA, autores da época especularam que seria interessante assistir uma competição esportiva, aos quais atletas estejam utilizando doses supra fisiológicas de testosterona (TODD, 1987). No começo de 1950 houve a primeira especulação de que a testosterona estava sendo administrada pela seleção soviética com finalidade de aumento de força, e conseqüentemente, performance esportiva (TODD, 1987). A testosterona, o principal EAA produzido em homens saudáveis, é secretada nas células de Leydig, as quais são responsáveis por aproximadamente 95% das concentrações séricas totais (CENTRE; MONITORING; AGENCY, 2008). Devido a descoberta de suas propriedades anabólicas, a testosterona se tornou notada principalmente pela capacidade de aumentar o tamanho muscular e força (CHEUNG; GROSSMANN, 2018). Entretanto, estes benefícios foram acompanhados de efeitos masculinizantes, denominados efeitos androgênicos (KICMAN; GOWER, 2003).

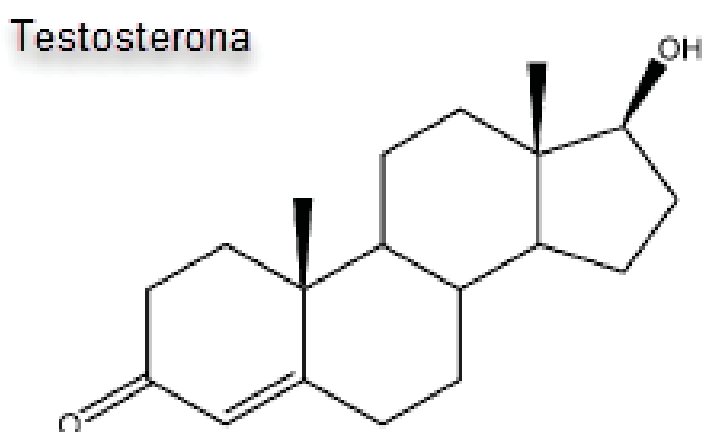


Figura 2. Estrutura molecular da testosterona. Adaptado de Fragkaki et al., (2009).

Enquanto isso, apesar das suspeitas de utilização de EAA com fins esportivos, farmacêuticos desenvolviam análogos derivados da testosterona com finalidades terapêuticas. Estes análogos derivados da testosterona foram criados com o objetivo

de aumentar os efeitos anabólicos e dissociá-los dos androgênicos (KICMAN; GOWER, 2003) e, conseqüentemente, aumentando sua aplicabilidade terapêutica. De fato, nandrolona (19-nortestosterona) foi o primeiro EAA, análogo da testosterona, que mostrou uma dissociação satisfatória de efeitos androgênicos e aumento dos anabólicos em experimento animal (HERSHBERGER; SHIPLEY; MEYER, 1953); justificando assim seu potencial terapêutico (KRÜSKEMPER, 2013). Além disto, outros análogos da testosterona foram produzidos. Alguns destes eram derivados da própria testosterona, e outros de metabólitos da conversão da testosterona em dehidrotestosterona (DHT), pela 5 α -redutase, desta forma foram criados metandienona, oximesterona e stanozolol (BUDAVARI, 1996).

Conforme descrito anteriormente, os EAA foram produzidos inicialmente com o objetivo de aumento do efeito anabólico. Entretanto, apesar deste objetivo inicial a literatura permaneceu controversa de mostrar estes efeitos no aumento de performance durante décadas, uma vez que ensaios clínicos randomizados da época possuíam falhas metodológicas que inviabilizavam tais conclusões (CHEUNG; GROSSMANN, 2018). Em 1996, foi mostrado por meio de um ensaio clínico randomizado que a administração de 600 mg de enantato de testosterona, com ou sem estímulo de treinamento, aumenta a massa e força muscular de homens saudáveis (BHASIN *et al.*, 1996). Além disto, os autores ainda sugerem que os EAA possuem efeito de potencializar os resultados do treinamento na massa e força muscular. De fato, este foi o primeiro ensaio clínico randomizado que apontou evidências de que a administração de EAA pode aumentar a performance.

Os efeitos anabólicos dos EAA foram mostrados ao longo de diversos estudos clínicos randomizados, os quais utilizavam de diferentes controles metodológicos com a finalidade de reproduzir situações reais de uso destas substâncias (GIORGI; WEATHERBY; MURPHY, 1999; ROGERSON *et al.*, 2007; STORER *et al.*, 2003). De fato, estes efeitos anabólicos podem ser explicados devido ao músculo esquelético ser um dos órgãos mais responsivos aos EAA. Além disto, as concentrações séricas de testosterona representam em média 40-67% de ganhos adicionais em massa muscular observada em ensaios clínicos randomizados (BHASIN; STORER, 2009). Nestes tecidos a testosterona é capaz de aumentar a síntese proteica (BRODSKY; BALAGOPAL; NAIR, 1996), promovendo uma maior eficiência na reutilização de aminoácidos e diminuindo a quebra de proteínas (FERRANDO *et al.*, 2003).

Consequentemente, mantendo estes tecidos em um balanço nitrogenado positivo, facilitando o aumento de performance esportiva.

Tem sido mostrado que a utilização de EAA pode apresentar benefícios na performance física através do aumento do aporte de oxigênio entregue à tecidos musculares e redistribuição do fluxo sanguíneo. De fato, a testosterona possui efeitos vasodilatadores na artéria e veia pulmonar de humanos e animais (ENGLISH *et al.*, 2001). Apesar de não ter sido ainda estudada na vasodilatação em doses supra fisiológicas, a administração de testosterona tem sido associada a rápidos efeitos dilatadores, e no fluxo sanguíneo, de artérias coronarianas (WEBB *et al.*, 1999). Consequentemente, criando a hipótese de que estas substâncias podem melhorar o débito cardíaco e, consequentemente, a performance física. Embora alguns estudos mostrem que a testosterona possui efeitos vasodilatadores, a literatura ainda permanece contraditória acerca destes efeitos. Enquanto alguns estudos mostram que a administração de EAA não causa uma melhora vascular (vasodilatação) (LY *et al.*, 2001; ZITZMANN; BRUNE; NIESCHLAG, 2002), outro mostra o efeito oposto (vasoconstrição) (SCHRÖR *et al.*, 1994).

Nesse sentido, tem sido mostrado que indivíduos que realizam a administração de testosterona de forma crônica podem possuir uma maior capilaridade muscular e também maior quantidade de mionúcleo por fibra muscular em comparação a indivíduos que nunca utilizaram tais drogas (YU *et al.*, 2014). Interessantemente, é sugerido ser necessário uma exposição prolongada de EAA, para que o sistema vascular se ajuste tal efeito, uma vez que protocolos de menor duração (até 20 semanas) não são capazes de apresentar tais efeitos (SINHA-HIKIM *et al.*, 2002). Portanto, parece que os efeitos benéficos da utilização de esteroides anabolizantes podem ser considerados protocolo dependentes, sendo a duração do protocolo fator determinante. Entretanto, apesar dos efeitos na melhoria da performance esportiva, estes podem ser acompanhados de diversos efeitos deletérios no SNC, os quais podem prejudicar a saúde de indivíduos que os utilizam de forma prolongada.

2.1.1 EAA: MECANISMOS DE AÇÃO

Os EAA podem realizar seus efeitos anabólicos ou androgênicos através da sua ligação ao receptor androgênico (RA) (GAO; BOHL; DALTON, 2005). O RA é

considerado um membro da família dos receptores esteroides e nucleares, a qual é constituída por cerca de 100 membros e pode ser classificado como um fator de transcrição dependente de ligante (Figura 4) (TRENT, 1999). De fato, os EAA podem exercer seus efeitos através de três mecanismos: genômicos, não-genômicos ou pela interação a sítios modulatório de neuroesteroides. O mecanismo genômico envolve a ação dos EAA diretamente na transcrição gênica. São realizadas mudanças conformacionais no domínio de ligação ao ligante (LBD) do RA, a qual irá desencadear subsequentes interações proteicas entre o receptor e outras proteínas celulares, até desencadear a expressão dos genes expressos via tal receptor (CLAESSENS *et al.*, 2001; PRATT; TOFT, 1997). De fato, o gene do RA possui um comprimento de 90kb e codifica uma proteína (o gene RA) de 919 aminoácidos com três domínios funcionais (Figura 3) (GAO; BOHL; DALTON, 2005). O domínio N-terminal (NTD), possui uma característica modulatória e é codificado pelo exon 1 (1585bp). O domínio de ligação ao DNA (DBD) é codificado pelos exons 2 e 3 (152 e 117bp, respectivamente) (MCEWAN, 2004). Por fim, o LBD é codificado por cinco exons que variam de tamanho de 131 a 288bp (GAO; BOHL; DALTON, 2005).

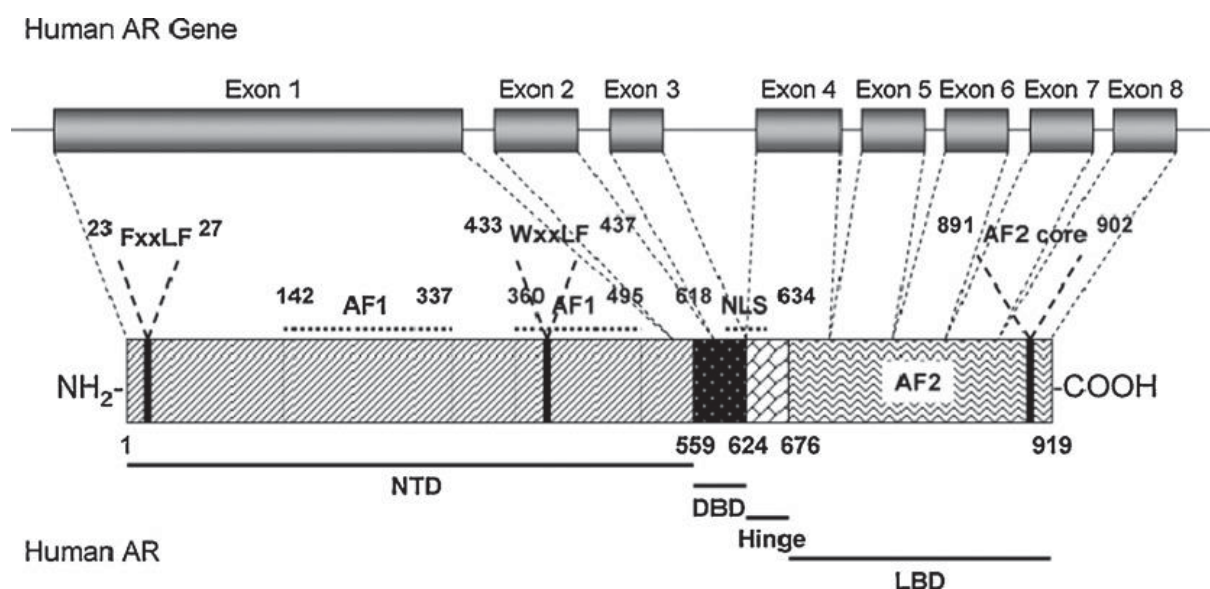


Figura 3. Organização estrutural do gene e proteína do RA. O EAA se liga ao LBD na proteína do RA, esta irá translocar seus dímeros até o elemento de resposta androgênica. Adaptado de Gao *et al.*, (2005).

O RA sem a ativação pelos EAA se encontra localizado no citoplasma associado a um complexo de proteínas de choque térmico, as quais se encontram ligadas no LBD (PRATT; TOFT, 1997). A partir de uma ligação agonista, os RA

realizam uma série de mudanças conformacionais: as proteínas de choque térmico se dissociam do LBD, o RA dissociado sofre dimerização e fosforização, posteriormente seus dímeros são translocados ao núcleo, sendo este efeito mediado via sinal de localização nuclear (FREEDMAN, 1998) O RA translocado irá se ligar ao elemento de resposta androgênica (ERA), o qual é caracterizado por seis nucleotídeos de half-site formados pela sequência 5'-TGTTCT-3' e espaçados por três nucleotídeos aleatórios (GAO; BOHL; DALTON, 2005). Além disto, a ativação da transcrição gênica mediada via RA requer o recrutamento de co-reguladores transcricionais (incluindo proteínas co-ativadoras e co-repressoras) (HEINLEIN; CHANG, 2002a) e recrutamento da RNA polimerase II (SHANG; MYERS; BROWN, 2002) , todos atuando em conjunto com a finalidade de ativar a expressão transcricional dos genes regulados pelo RA. Conseqüentemente, os EAA podem ativar uma série de vias de sinalizações anabólicas, sendo estas mediadas via IGF-1 e subsequente fosforilação da via de sinalização Akt/mTORc1, a qual encontra seu substrato final a proteína p70^{s6K}. Além disto, os EAA podem desencadear a ativação de células satélites e, por fim, inibição da via catabólica da miostatina (Figura 4) (DE ROOY *et al.*, 2016). Conseqüentemente, favorecendo processos que possuem importante papel na síntese proteica e, possivelmente, aumento da performance física.

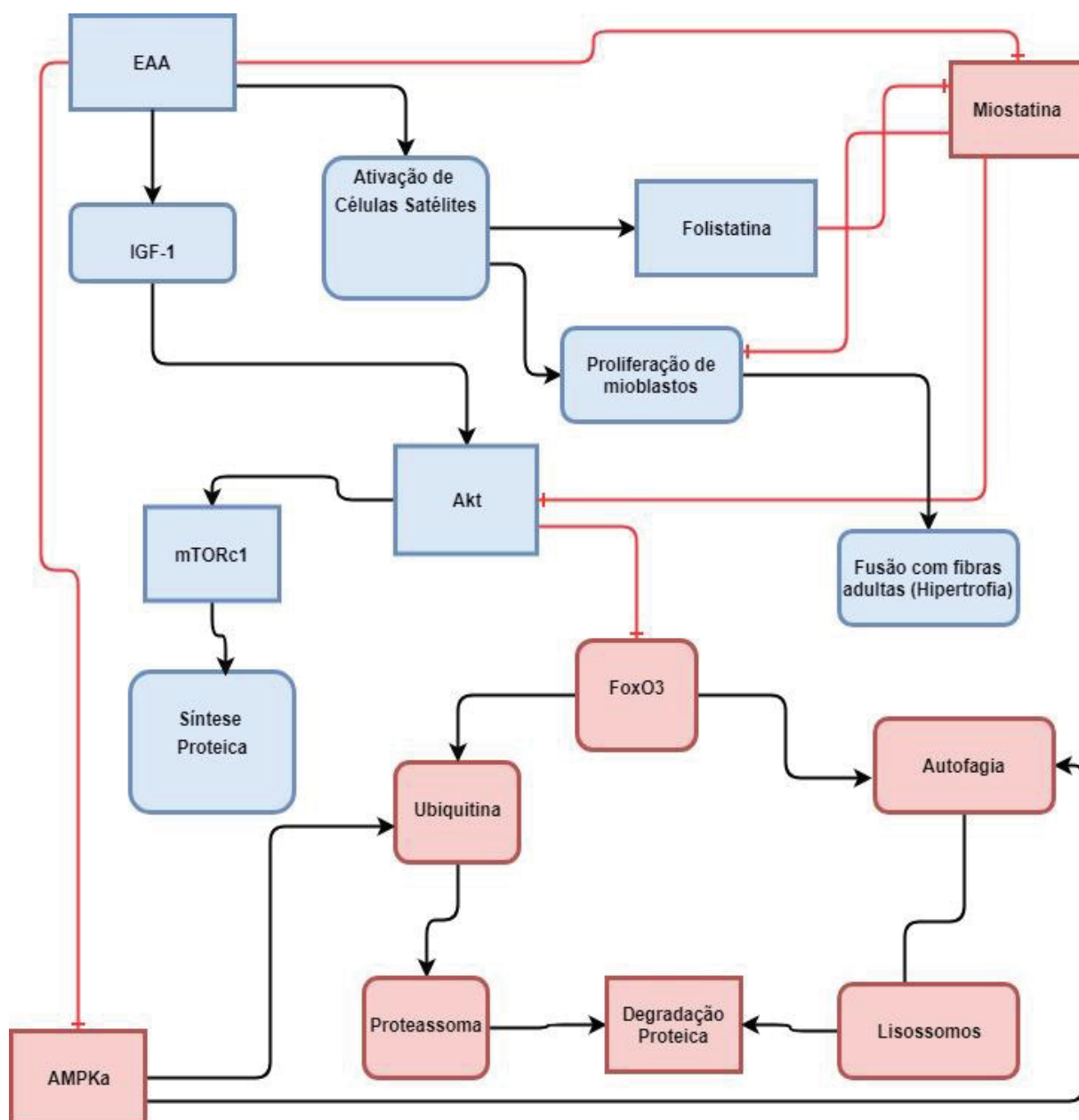


Figura 4. Vias de sinalização compreendendo os efeitos anabólicos dos esteroides anabolizantes androgênicos. Vias azuis são consideradas anabólicas, enquanto vermelhas catabólicas. Adaptado de de Rooy et al., (2016).

Um segundo mecanismo de ação dos EAA nos RA foi sugerido em células do tecido musculoesquelético (ESTRADA *et al.*, 2003), oocistos (LUTZ *et al.*, 2003), células cancerígenas prostáticas (KAMPA *et al.*, 2002; UNNI *et al.*, 2004) e osteoblastos (KOUSTENI *et al.*, 2001; ZAGAR; CHAUMAZ; LIEBERHERR, 2004). A via de ação não-genômica induz interações rápidas, as quais podem variar de segundos a uma hora (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004), bem como este

mecanismo de ação dos EAA envolve a interação direta entre o RA e proteínas citosólicas de diferentes vias de sinalização (i.e. Proteína-quinases ativadas por mitógenos, MAPK, e proteína quinase B ,AKT), desencadeando mudanças na função celular independentemente de alterações transcricionais, tais como mudanças no transporte iônico (HEINLEIN; CHANG, 2002b; NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004). Estas vias uma vez desencadeadas, estão intimamente relacionado com as mudanças conformacionais induzidas pelo ligante (EAA) no LDB ou, alostericamente no NTD (GAO; BOHL; DALTON, 2005). Além disto, tem sido mostrado que esta alteração nos níveis intracelulares de cálcio pelo mecanismo não genômico está associada à estimulação das junções comunicantes, plasticidade neuronal e relaxamento aórtico (SIMONCINI; GENAZZANI, 2003). Contudo, o mecanismo destas interações ainda não está bem descrito na literatura. Sendo importante a separação e entendimento das funções dos mecanismos genômicos e não genômicos dos EAA, a fim de propor novas estratégias de seletividade tecidual na utilização de fármacos (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004).

Por fim, os EAA podem exercer efeitos através da interação com neuroesteroides, compartilhando o mesmo sítio modulatório de receptores N-metil-D-Aspartato (NMDAR) (JANG *et al.*, 2004; PARK-CHUNG *et al.*, 1997), sigma-1 (MAURICE *et al.*, 2001) e receptor para o ácido gama-aminobutírico (GABA), GABA_A (MAJEWSKA, 1992). Os neuroesteroides são compostos endógenos derivados do colesterol, são sintetizados no sistema nervoso central (SNC) e podem induzir rápidos efeitos mediados via receptores acoplados a membrana celular (COMPAGNONE; MELLON, 2000). Uma variedade de neuroesteroides estão presentes no SNC, incluindo classes de pregnano, androstano e estrogênio (REDDY; ESTES, 2016a). São altamente lipofílicos e, portanto, são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (REDDY; ESTES, 2016b). De fato, estes neuroesteroides possuem todas as enzimas necessárias para a sua síntese no SNC, uma vez que são sintetizados em neurônios e glias de várias regiões cerebrais (REDDY, 2011, 2010).

De fato, podem interagir diretamente com os NMDAR em altas concentrações (HORAK *et al.*, 2004) ou alostericamente em concentrações fisiológicas (PARK-CHUNG *et al.*, 1997). Os neuroesteroides possuem um importante papel em processos vitais, incluindo memória, aprendizado (SHIMIZU *et al.*, 2000), neuroplasticidade (KLANGKALYA, 2005) e neuroproteção em doença de Alzheimer (WEILL-ENGERER *et al.*, 2002). Além disto, são facilitadores GABAérgicos (CLARK;

MITRE; BRINCK-JOHNSEN, 1995a; COMPAGNONE; MELLON, 2000) e aos receptores sigma-1 (MONNET; MAURICE, 2006).

2.1.2 EAA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Tem sido mostrado que a administração de EAA podem causar mudanças comportamentais, causando alterações no SNC. De fato, a administração de EAA tem sido associada com o aumento do comportamento agressivo (LONG *et al.*, 1996), ansiogênico (JOKSIMOVIC *et al.*, 2019; ROSIC *et al.*, 2014; SELAKOVIC *et al.*, 2017) e altera sistema de recompensa cerebral (KAILANTO; KANKAANPÄÄ; SEPPÄLÄ, 2011).

O efeito da DN (Figura 5) no comportamento agressivo parece ainda não estar bem descrito na literatura. Enquanto estudos mostram um aumento na agressividade induzido por DN (KALININE *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 1996) outros sugerem que não há aumento do comportamento agressivo (BREUER *et al.*, 2001; FARRELL; MCGINNIS, 2003; MCGINNIS *et al.*, 2002; WESSON; MCGINNIS, 2006). Estas divergências possivelmente podem ser explicadas devido à diferentes modelos metodológicos, principalmente pela duração e frequência de administração do tratamento. Estudos mostram que a administração de 5mg/kg de EAA (propionato de testosterona e stanozolol) durante 12 semanas, em ratos, aumentou o comportamento agressivo em comparação ao grupo controle (BREUER *et al.*, 2001). Adicionalmente, a administração de um coquetel de EAA (DN, testosterona e boldenona) durante 14 dias aumentou os ataques e mordidas realizadas por ratos ao intruso em comparação ao grupo controle (CLARK; HENDERSON, 2003; MELLONI JR *et al.*, 1997; MELLONI; FERRIS, 1996). Entretanto, estudos prévios mostram que ratos tratados de forma prolongada com DN mostram números de ataques a intrusos similares ao grupo controle (ALBERT; WALSH; JONIK, 1993; LONG *et al.*, 1996).

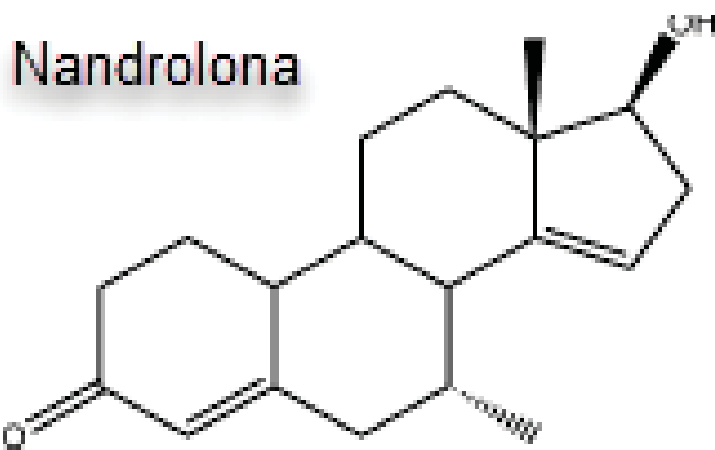


Figura 5. Estrutura molecular da 19-nor-testosterona. Adaptado de Segaloff et al., (1963).

Corroborando isto, estudos não mostram uma relação da administração da DN em ratos e comportamento agressivo (FARRELL; MCGINNIS, 2004; MCGINNIS, 2004). Além disto, mesmo com o protocolo experimental replicado (MCGINNIS *et al.*, 2002), estudos reportaram a falta de efeito da utilização de DN e comportamento agressivo (BREUER *et al.*, 2001). Concluindo, apesar dos EAA causarem efeitos deletérios no SNC, a literatura ainda permanece divergentes acerca dos efeitos do uso de EAA e comportamento agressivo, bem como necessita de mais estudos que avaliem esta variável em animais tratados com EAA.

Por fim, a administração de DN causa resposta dopaminérgica similares a psicoestimulantes. Tem sido mostrado que a cocaína e anfetamina podem aumentar as concentrações extracelulares de dopamina através da inibição de transportadores de receptação dopaminérgicos (GIROS *et al.*, 1996). De fato, a administração de DN causa *up-regulation* dos transportadores de dopamina no putâmen de ratos (KINDLUNDH *et al.*, 2002, 2004), aumentando a captação de dopamina. Adicionalmente, estudo avaliou o efeito da administração aguda de anfetamina antes e depois de um tratamento com DN, testosterona e boldenona (2, 2, 1 mg/kg durante 14 dias, respectivamente) (CLARK; LINDENFELD; GIBBONS, 1996). Os resultados apontam que embora a utilização da DN não tenha efeito direto no sistema de recompensas, sua administração pode potencializar a recompensa induzida pela anfetamina.

2.1.3 EAA E MEMÓRIA

A partir do supracitado, cria-se a premissa que a administração de EAA pode interferir em algumas funções do SNC principalmente em usuários que o utilizam de forma prolongada. De fato, um estudo avaliou 45 homens atletas, dos quais 31 usuários de EAA e 14 não usuários e comparou os dois grupos em uma bateria de testes neuropsicológicos. Os resultados demonstram que usuários de EAA possuem menor memória visuo-espacial e reconhecimento de padrões (KANAYAMA *et al.*, 2013). Contudo, vale ressaltar as limitações apontadas pelos autores, tais como o tamanho amostral relativamente pequeno, o menor nível de instrução educacional dos usuários de EAA e o menor número amostral dos não usuários.

Estudos em animais apontam que a administração aguda e prolongada de DN pode prejudicar a performance de tarefas de memória e aprendizado espacial, bem como memória social olfatória de ratos (KARAMIAN *et al.*, 2014; KOUVELAS *et al.*, 2008; MAGNUSSON *et al.*, 2009a). Todavia, a literatura ainda diverge acerca dos efeitos dos EAA e memória. Estudo aponta que a memória espacial de trabalho, motivação e habilidades sensor motoras permanecem inalteradas com uma administração crônica de um coquetel de EAA, 17 α -metiltestosterona, methandrostelona e cipionato de testosterona (SMITH; STACKMAN; CLARK, 1996).

Tem sido mostrado que a administração de 15 mg/kg de DN a cada três dias, durante 14 dias prejudicou a memória espacial de ratos no teste de labirinto aquático de Morris (MAGNUSSON *et al.*, 2009a). Em adição, os autores também apontam uma maior expressão de RNAm de prodinorfina hipocampal em ratos tratados com DN. De fato, o DN pode provocar alterações nos níveis de dinorfina B (JOHANSSON *et al.*, 2000), na conversão enzimática da dinorfina A (MAGNUSSON *et al.*, 2007) e finalmente na densidade dos receptores kappa opioides (MAGNUSSON *et al.*, 2009b). Corroborando estes achados, estudos indicam que a administração intrahipocampal de dinorfina A (AHIMA; HARLAN, 1992; COLOMBO *et al.*, 1992) e dinorfina B (MCDANIEL; MUNDY; TILSON, 1990; SANDIN *et al.*, 1998) podem prejudicar a memória espacial de ratos. De acordo com estes achados, em conjunto com a maior expressão de RNAm de prodinorfina encontrada no hipocampo com a administração de DN, os autores especulam um possível mecanismo do impacto dos EAA na memória. Entretanto, vale ressaltar que nem sempre elevados níveis transcricionais

de prodinorfina irão refletir em maiores níveis de tradução proteica, bem como a ausência de tratamento farmacológico que caracterize uma possível causa mecanicista.

Ademais, estudo prévio verificou o efeito da administração crônica de 15 mg/kg de DN, durante 6 semanas, na memória e aprendizado social olfatória de ratos. Os resultados indicaram que enquanto o aprendizado social olfatório permaneceu inalterado, a memória social olfatória foi significativamente menor nos ratos tratados com DN. Além disto, vale ressaltar que a administração da flutamida, um antagonista do receptor androgênico, junto a DN aboliu o déficit de memória provocado pelo protocolo experimental; indicando um envolvimento do RA na perda de memória provocada pelos EAA (KOUVELAS *et al.*, 2008).

Por fim, foi verificado o efeito da administração intrahipocampal aguda de DN na memória e aprendizado espacial de ratos, submetidos a diferentes dosagens. Os resultados apontam que somente em doses de 1 µl min houve redução do aprendizado e da memória, enquanto dosagens maiores (10 µl) e menores (1 µl), as variáveis permaneceram inalteradas (KARAMIAN *et al.*, 2014). Além disto, os autores apontam sinais de necrose em alguns neurônios na região CA1 do hipocampo, apenas na dosagem de 5 µl, assim sendo, a administração de DN pode interferir em processos neurodegenerativos.

2.2 MEMÓRIA DECLARATIVA

As memórias podem ser conceituadas, para o autor desta dissertação, como uma mudança de comportamento realizada com base em experiências prévias. Estas que são adquiridas, consolidadas ou extintas com a necessidade de uma mudança na força de transmissão sináptica e aumento da síntese proteica. As memórias podem ser divididas em implícitas (ou processurais) e explícitas (ou declarativas). As memórias declarativas são memórias que podem ser evocadas e descritas verbalmente de forma consciente, podem ser incluídas memórias de eventos prévios (episódicas) ou fatos (semântica) (RUTISHAUSER, 2019). Além disto, as memórias declarativas são de extrema importância uma vez que podem mudar o comportamento humano e com isto podem criar uma identidade pessoal que nos define de acordo com nossas experiências (SQUIRE; STARK; CLARK, 2004).

Estudo clássico mostrou que o hipocampo possui uma participação crítica nas memórias declarativas (COHEN; SQUIRE, 1980). De fato, o hipocampo suporta as memórias declarativas de forma que funciona como um mecanismo de processamento de diferentes tarefas e experiências que irão nos fornecer subsídios para a formação da memória (EICHENBAUM; OTHERS, 1993). Nesse sentido, o hipocampo cria representações relacionadas as experiências que estão sendo vivenciadas que relacionam com outras memórias já consolidadas, realizando este link entre elementos comuns e compondo o que se chama de espaço de memória (EICHENBAUM *et al.*, 1999). Além disto, esta importância é corroborada com estudos que mostram que uma lesão no hipocampo de macacos o prejuízo na memória é mais severo à medida que a lesão é mais é de maior magnitude, por exemplo quando a lesão engloba quase todo o hipocampo (ZOLA-MORGAN *et al.*, 1992). Além disto, estudos com eletrofisiologia mostram que há expressão de NMDAR nas regiões hipocampais, e estes possuem um importante papel na mudança da plasticidade sináptica desta região encefálica (BELLONE; NICOLL, 2007), sendo que as características deste receptor ionotrópico e sua importância para processos de memória iremos discutir a seguir.

2.3 RECEPTORES N-METIL-D-ASPARTATO

Ao longo do SNC, o aminoácido glutamato realiza a maioria das neurotransmissões sinápticas excitatórias (TRAYNELIS *et al.*, 2010). Os canais iônicos ativos por glutamato são importantes moduladores da plasticidade cerebral e são capazes de converter atividades neuronais específicas em mudanças de longa duração na estrutura e função sináptica, as quais possuem importante papel em funções cognitivas (TRAYNELIS *et al.*, 2010). Dentre os receptores ativos por glutamato pode-se destacar os NMDAR, os quais são objetos de estudo do presente trabalho. Estudos de clonagem revelam que os NMDAR são constituídos de heterodímeros. De fato, estes receptores podem ser compostos por sete diferentes subunidades, as quais fazem parte de três subfamílias identificadas (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004; PAOLETTI, 2011; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Sendo elas, a subunidade GluN1, quatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C e GluN2D) que são codificadas por quatro diferentes genes; e por último, as subunidades GluN3 (GluN3A e GluN3B) sendo codificadas por dois diferentes genes. Além disto, estas

subunidades possuem uma quantidade de aminoácidos que varia de 900 a 1480. Esta variação no tamanho das subunidades se deve às diferenças no comprimento do domínio intracelular carboxílico; uma região com a função se acoplar os receptores às cascatas de sinalização (TRAYNELIS *et al.*, 2010).

Os NMDAr (Figura 6) são formados por subunidades GluN1 obrigatórias junto a GluN2A ou GluN2B, ou através de uma mistura de subunidades GluN2 e GluN3 (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004; PAOLETTI, 2011; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Além disto, os NMDAr possuem notáveis propriedades que os diferem dos outros receptores ionotrópicos. Primeiro, no potencial de membrana de repouso estes receptores são bloqueados por voltagem pelo íon Mg^{2+} , o qual impede o influxo de Ca^{2+} e transmissão sináptica excitatória. Segundo, são altamente permeáveis a íons Ca^{2+} . Terceiro, possuem uma cinética lenta, devido à também desaceleração lenta por parte do glutamato; sua ativação requer não só a presença do neurotransmissor glutamato, mas também de um co-agonista (glicina ou D-serina). Por fim, possuem uma série de sítios modulatório, resultando em uma excelente sensibilidade ao ambiente extracelular (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004; PAOLETTI, 2011; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Além disto, o bloqueio da condução iônica realizado pelo Mg^{2+} , bem como o influxo de Ca^{2+} podem ser influenciados pela composição de subunidades que compõem os NMDAr. Por exemplo, quando os NMDAr são compostos pelas subunidades GluN2A ou GluN2B geram um canal de alta condutância quando ativos, sensibilidade ao bloqueio pelo Mg^{2+} e permeabilidade a Ca^{2+} . Entretanto, quando compostos pelas subunidades GluN2C ou GluN2D possuem baixa condutância, sensibilidade ao Mg^{2+} e permeabilidade a Ca^{2+} (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004; PAOLETTI, 2011; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Portanto, as subunidades que compõem os NMDAr podem influenciar em suas características e funcionalidades.

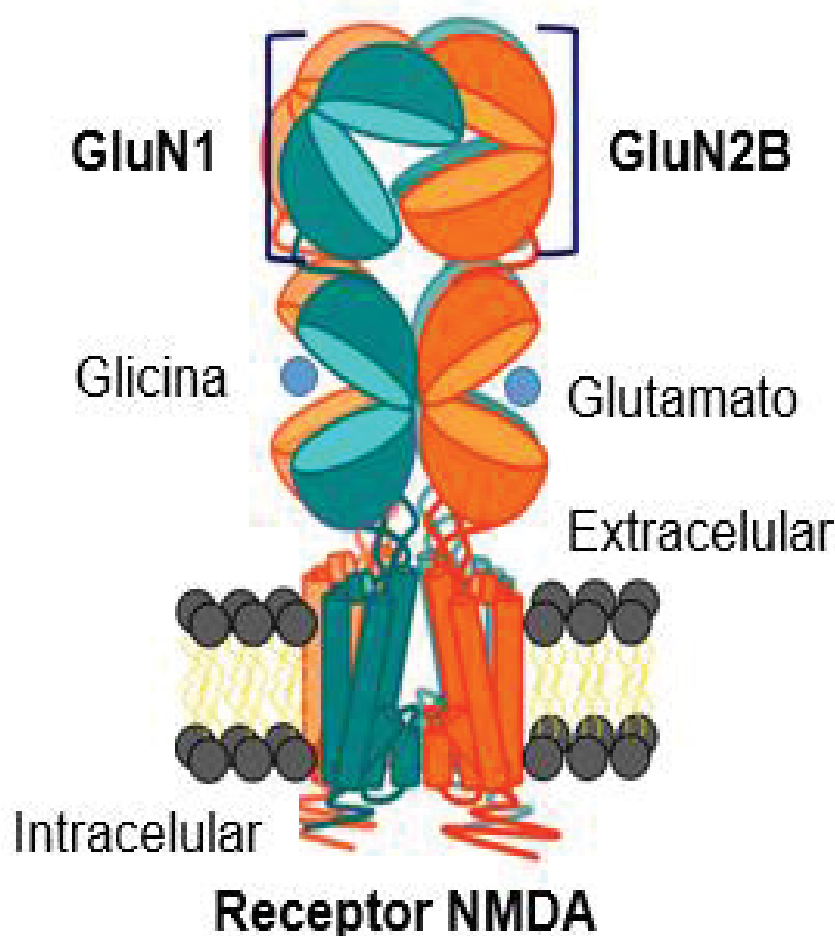


Figura 6- Estrutura do receptor NMDA. Adaptado de SIRRIEH *et al.*, (2015).

Os NMDAr possuem pequenos sítios modulatório onde pequenas moléculas podem agir como moduladoras alostéricas positivas ou negativas; adicionalmente, esta modulação pode ser considerada subunidade específica (PAOLETTI, 2011; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Muitos destes moduladores podem distinguir entre as subunidades dos receptores, sendo possível que devido a esta especificidade de ligação pode contribuir para se tornar potenciais terapeutas farmacológicos (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). Dentre estes moduladores endógenos, podemos destacar os prótons, poliaminas e Zn^{2+} , os quais podem agir como potentes moduladores dos NMDAr (PAOLETTI, 2011). Ademais, tem sido mostrado que a sensibilidade por prótons possui um papel crítico nos NMDAr, sendo um dos mecanismos que poliaminas e antagonistas de NMDAr, especialmente ifenprodil, podem atuar nestes receptores. A literatura apresenta efeitos opostos do ifenprodil e

poliaminas no sensor de prótons dos NMDAR. De fato, o sensor de prótons é um ponto de convergência para a ação de diversos moduladores alostéricos, os quais podem aumentar ou diminuir a atividade dos receptores através do aumento ou diminuição da sensibilidade aos prótons. Duas décadas atrás, estudos mostraram que os prótons extracelulares podem inibir cerca de 50% a condutância de Ca^{2+} dos NMDAR em um pH fisiológico (TRAYNELIS; CULL-CANDY, 1990; TRAYNELIS; HARTLEY; HEINEMANN, 1995a; VELÍŠEK *et al.*, 1994). Posteriormente, foi descoberto moduladores alostéricos dos NMDAR que poderiam ser positivos ou negativos dependendo da ação na protonação no NMDAr, se incluindo zinco, feniletanolamina, ifenprodil e poliaminas (BHATT *et al.*, 2013; GIELEN *et al.*, 2008; LOW *et al.*, 2000; MASUKO *et al.*, 1999; MONY *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2001).

Nessa continuidade, as poliaminas podem diminuir a sensibilidade por prótons nos NMDAR contendo as subunidades GluN1/GluN2B, resultando em um aumento no influxo de íons mediados via NMDAr (MONY *et al.*, 2011; SULLIVAN *et al.*, 1994; TRAYNELIS; HARTLEY; HEINEMANN, 1995b). Em contrapartida, tem sido mostrado que o ifenprodil possui efeito oposto, aumentando a sensibilidade por prótons nas subunidades GluN1/GLuN2b (PAHK; WILLIAMS, 1997; WHITTEMORE *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2001). Concluindo, baseado no supracitado os NMDAr possuem um importante papel em funções fisiológicas do SNC. De fato, graças as suas características e funções podem promover a sobrevivência neuronal, mudanças na eficácia sináptica além de estarem intimamente ligados ao processo aprendizado e memória (HARDINGHAM; BADING, 2010; MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998).

2.3.1 NMDAR E MEMÓRIA

De acordo com as funções e características dos NMDAR descritas, estes possuem um importante papel na plasticidade sináptica. De fato, plasticidade sináptica é um termo genérico utilizado para uma mudança na força e duração da transmissão sináptica, sendo mediada via NMDAr. De fato, estas mudanças podem ser caracterizada como potencialização de longa duração (LTP) ou depressão de longa duração (LTD), que se relacionam com o processo de aprendizado e evocação de memória (LÜSCHER; MALENKA, 2012). Após a liberação do neurotransmissor glutamato, este difunde-se rapidamente até a membrana pós-sináptica onde irá se ligar ao seu respectivo receptor (NMDA,AMPA) (LÜSCHER; MALENKA, 2012).

Ademais, quando ativos, os NMDAR possuem uma cinética mais lenta em comparação a outros receptores de glutamato; podendo permanecer com os canais abertos durante mais tempo (LÜSCHER; MALENKA, 2012). Sendo este mecanismo essencial para sua contribuição na plasticidade sináptica, os quais discutiremos a seguir.

PLD e DLD são evocados por mecanismos de atividade específicos destes receptores. De fato, para a indução do LTP tanto neurônios pré-sinápticos quanto pós-sinápticos devem estar despolarizados e ativos ao mesmo momento da liberação de glutamato; este sincronismo possui a finalidade de liberar o bloqueio realizado pelo íon Mg^{2+} , o qual impede o influxo de Ca^{2+} no potencial de repouso (MALENKA, 1994). Como consequência deste sincronismo, há liberação do bloqueio pelo Mg^{2+} e o influxo de Ca^{2+} através do canal é máximo, o qual irá ativar cascatas de sinalização que irão desencadear mudanças na força sináptica; e por consequência, evocação de LTP (LÜSCHER; MALENKA, 2012). Portanto, LTP via ativação de NMDAR é uma forma de plasticidade sináptica que possui origem no fortalecimento da conexão entre dois neurônios (HEBB, 1961).

Entretanto, uma vez que a LTP envolve a liberação máxima de influxo de Ca^{2+} , devido a um estímulo de alta frequência, a LTD parece ser realizada pelo mesmo mecanismo, mas de menor grau de magnitude. Em outras palavras, devido ao incompleto bloqueio dos canais realizado pelo íon Mg^{2+} , quando há uma estimulação de baixa frequência ocorre um rompimento do bloqueio inibitório no poro do receptor e, conseqüente, entrada de influxo de Ca^{2+} (BLOODGOOD; GIESSEL; SABATINI, 2009; BLOODGOOD; SABATINI, 2007; SABATINI; OERTNER; SVOBODA, 2002). Nesse sentido, enquanto repetidas estimulações sinápticas de baixa frequência irão desencadear menor influxo de cálcio e indução de LTD, fortes despolarizações podem induzir LTP.

Em teoria, para indução de LTP e conseqüente processo de aprendizado e evocação memória, este processo pode ser desencadeado por uma maior liberação de neurotransmissores por parte do axônio pré-sináptico; ou através da mesma quantidade de neurotransmissor, porém com sincronizada despolarização e maior sensibilidade do neurônio pós-sináptico (LÜSCHER; MALENKA, 2012). Além disto, tem sido mostrado que os processos relacionados à plasticidade sináptica (LTP e LTD) envolvem a inserção de novos receptores de glutamato. De fato, estudos mostram que após um protocolo de indução de LTP as sinapses “acordam” e se

tornam mais efetivas devido a inserção de novos receptores AMPA na membrana pós-sináptica (ISAAC; NICOLL; MALENKA, 1995; LIAO; HESSLER; MALINOW, 1995). Estes resultados aumentaram a hipótese de que receptores AMPA já são contidos na membrana pós-sináptica, enquanto LTP envolve a inserção de novos receptores, LTD seria a remoção destes receptores (LLEDO *et al.*, 1998; LÜSCHER *et al.*, 1999).

Após a ativação glutamatérgica do tipo NMDA e, posterior, entrada de Ca^{2+} , ocorre uma série de vias de sinalização sendo fosforiladas as quais serão necessárias para evocação de LTP. Dentre elas podemos destacar o recrutamento de proteínas quinases dependente de cálcio II/calmodulina (CaMKII) (LISMAN; SCHULMAN; CLINE, 2002). Conseqüentemente, desencadeando a fosforilação de várias proteínas incluindo os próprios receptores AMPA (DERKACH; BARRIA; SODERLING, [s. d.]), como consequência desta fosforilação irá aumentar a condutância nos receptores de glutamato (BENKE *et al.*, 1998); como mencionado anteriormente um dos mecanismos necessários para a indução de LTP. Em adição, o aumento da atividade da CAMKII contribui para a inserção de novos receptores AMPA (EHLERS, 2000); contribuindo para todo o mecanismo de LTP no supracitado e, conseqüentemente, processos de aprendizado e evocação de memória.

A memória é representada, a nível celular, como um processo dependente de estruturas e funções específicas das conexões sinápticas entre dois neurônios, a qual depende da ativação da expressão de alguns genes (KANDEL, 2001). Em outras palavras, memória pode ser vista como uma forma de mudança no comportamento a partir do aprendizado de experiências prévias as quais dependem de processos celulares como plasticidade sináptica e síntese proteica. Evidências apontam que além do importante papel da CAMKII no processo de PLD e memória mediado pelos NMDAR, outras proteínas quinases fazem parte do processo. De fato, proteínas quinases como proteína quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) já foram mostradas estarem envolvidas no processo de evocação e consolidação de memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; MALENKA; NICOLL, 1999; SALTER; KALIA, 2004; SWEATT, 2004). Após a fosforilação destas proteínas, estudos mostram que para o processo de consolidação da memória é requerida um aumento na síntese proteica, esta que se dá devido a um aumento da transcrição gênica mediada via elemento de resposta ao cAMP(CREB), o qual é fosforilado após a fosforilação de proteínas quinases como PKA, MAPK e CAMKII (MONTMINY, 1997).

Por exemplo, o aumento no influxo de Ca^{2+} mediados via NMDAr, há uma fosforilação das proteínas CAMKII, cAMP e PKA, as quais irão resultar na fosforilação e ativação do CREB (BITO; DEISSEROTH; TSIEN, 1996). Posteriormente, desencadeando a ativação de genes no DNA que irão aumentar o processo do gene somatostatina, por consequência, desencadear o processos de consolidação da memória (KANDEL, 2012). Concluindo, para desencadear os processos de memória é necessário um sincronismo por parte do neurônio pré e pós-sináptico, os quais irão sensibilizar os NMDAr a mesma quantidade de neurotransmissor liberado; ou a uma elevada concentração liberada na fenda pós-sináptica. Por consequência deste pressuposto, várias vias de fosforilação *down-stream* serão ativadas; com a ativação e fosforilação de proteínas quinases, as quais fosforilam fatores de transcrições necessários para iniciar processos de síntese proteica que são requeridos para a consolidação da memória.

2.3.2 NMDAR E EXCITOTOXIDADE

O influxo de Ca^{2+} mediado via ativação dos NMDAr é de extrema importância para processos vitais no SNC, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e memória. Entretanto, os neurônios necessitam de um controle homeostático deste mecanismo, devido a vias neurotóxicas que podem ser desencadeadas devido a uma regulação anormal do influxo deste íon. De fato, dentro de condições fisiológicas, neurônios podem controlar esta homeostasia através da regulação de níveis intracelulares, regulação da entrada, saída e controle no armazenamento de cálcio (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003). Entretanto, o aumento do influxo de Ca^{2+} , ou elevada liberação por parte do armazenamento intracelular podem aumentar os níveis de cálcio a uma magnitude maior que o neurônio consegue regular (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003). Esta falha na regulação intracelular irá desencadear a ativação inapropriada de vias de sinalização dependentes de cálcio, causando desordens metabólicas e eventual morte celular (CHOI, 1988a; SATTLER; TYMIANSKI, 2000; TYMIANSKI; TATOR, 1996). Por exemplo, o influxo anormal de Ca^{2+} intracelular pode gerar a elevada ativação de proteases, calpainas, lipases e fosfatases que podem causar dano diretamente a estrutura neuronal, ou indiretamente através do aumento de espécies reativas de oxigênio (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003); podendo levar à apoptose

celular. Este processo neurotóxico mediado via NMDAR é chamado de excitotoxicidade. Apesar do aumento excessivo do influxo de Ca^{2+} não ser o único mecanismo capaz de causar neurotoxicidade, evidências suportam a relação entre a excitotoxicidade e processos neurodegenerativos (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003; CHOI, 1994; TYMIANSKI; TATOR, 1996). Em adição, estudos apontam uma forte relação entre o volume excessivo de Ca^{2+} e o dano celular mediado por receptores de glutamato (CHOI, 1988b; TYMIANSKI, 1996; TYMIANSKI; TATOR, 1996).

Tem sido mostrado que enquanto a excitotoxicidade mediada via receptores dependente de voltagem não causaram prejuízos neurais, a mesma magnitude de influxo de Ca^{2+} mediada via NMDAR teve efeito neurotóxico (TYMIANSKI *et al.*, 1993). De fato, tem sido sugerido que a mesma magnitude de facilitação nos NMDAR, não desencadeia eventos neurotóxicos quando mediada via outros receptores de glutamato (SATTLER *et al.*, 1998; TYMIANSKI *et al.*, 1993). Possivelmente pode ser explicado devido a estudo prévio ter mostrado que os NMDAR possuem mais substratos responsivos a vias neurotóxicas em comparação a outros receptores ativos por glutamato (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003).

Nesse sentido, tem sido proposto a utilização de antagonistas dos NMDAR como forma de atenuar a transmissão glutamatérgica, quando elevada, e com isto possibilitar uma possível diminuição processos neurodegenerativos (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). De fato, a elevação anormal desta transmissão pode contribuir para a perda sináptica e neuronal, tais como acontece em doenças degenerativas como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013), sendo contribuinte para a perda de memória observada nestas patologias que envolvem excitotoxicidade mediada via NMDAR (TRINCHESE *et al.*, 2008; VOSLER; BRENNAN; CHEN, 2008).

2.4 POLIAMINAS

As poliaminas (PA) são aminas alifáticas presentes em todos os tecidos e células examinados de animais e plantas (HANDA; FATIMA; MATTOO, 2018) e apresentam concentrações maiores no SNC (Figura 7). As poliaminas desempenham diversas funções específicas em múltiplos processos celulares: apoptose, divisão celular e diferenciação, proliferação celular, DNA, síntese proteica, expressão gênica, homeostase e transdução de sinais (ANWAR; MATTOO; HANDA, 2015; COHEN,

1998; KAUR-SAWHNEY *et al.*, 2003; KUSANO *et al.*, 2008; MUSHTAQ *et al.*, 2016; PEGG, 2016). As PA endógenas são sintetizadas a partir do aminoácido arginina e ornitina. Primeiro, a arginina é convertida em ornitina pela arginase mitocondrial; segundo, sofre ação da enzima ornitina descarboxilase formando a putrescina, a qual é precursora da espermina e espermidina. Posteriormente, a enzima espermina sintase transfere um grupo aminopropil para a putrescina, formando a espermidina. Com a transferência de outro grupo aminopropil para a espermidina, forma-se a espermina (PEGG, 2009, 2016; PEGG; MICHAEL, 2010; URDIALES; MEDINA; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2001).

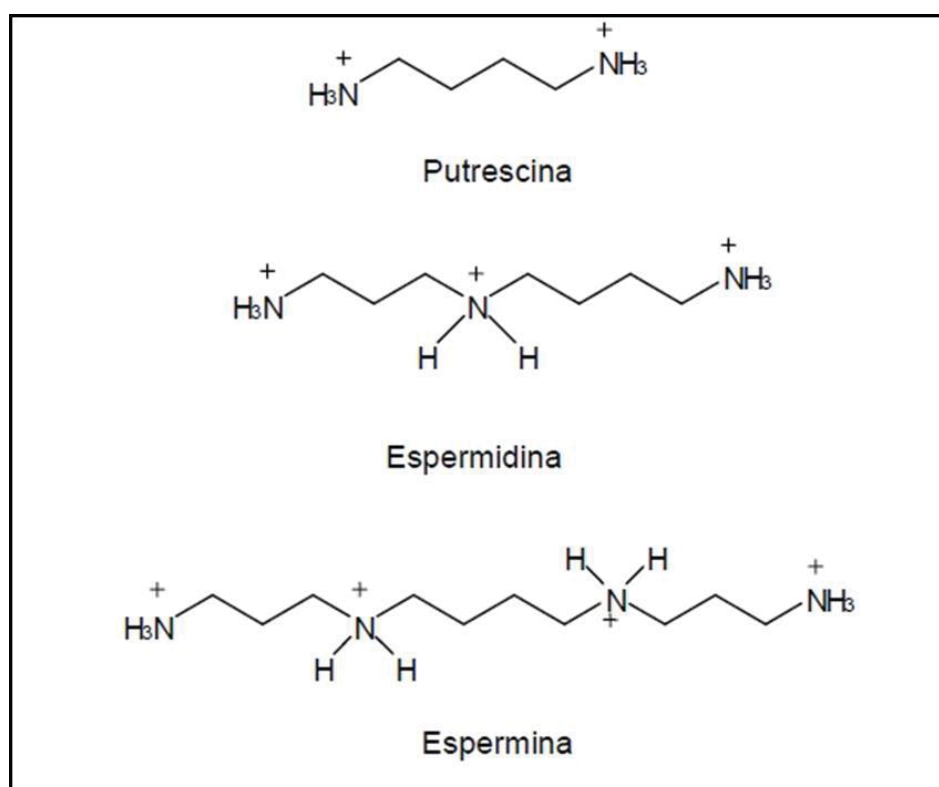


Figura 7. Estrutura química das poliaminas. Adaptado de TETI *et al.*, (2002).

As PA podem atuar em diversas funções celulares através de múltiplos alvos que podem sofrer influência destas moléculas. De fato, evidências sugerem que as PA podem atuar de forma estrutural nos ácidos nucleicos; aumentado a estabilidade do RNAt e possui importante função na estabilidade e tradução do RNAm (LIGHTFOOT; HALL, 2014; MILLER-FLEMING *et al.*, 2015). Além disto, as PA também podem exercer importantes funções através de interações com proteínas, sejam elas proteínas quinases ou canais iônicos. De fato, podem interagir com

proteínas quinases envolvidas em diversas funções celulares; ativando caseína quinase 2 (CK2) (BORGIO *et al.*, 2015; LEROY *et al.*, 1997). Esta por sua vez, irá desencadear vias que resultam na fosforilação da proteína Raf, uma vez que Raf é fosforilada irá ocasionar mudanças nos níveis intracelulares de PA, podendo ativar a via proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (STARK *et al.*, 2011), sugerindo-se que estas moléculas podem atuar em diferentes vias celulares a jusante que são de extrema importância para várias funções celulares.

Ademais, as PA podem atuar em diferentes receptores de glutamato e modular sua atividade, atuando como moduladoras alostéricas positivas ou negativas dependendo de qual receptor de glutamato está se ligando (WEDGWOOD; WOLSTENCROFF, 1977). Tem sido mostrado que as PA podem inibir os receptores AMPA e cainato, bloqueando a entrada de Ca^{2+} através destes receptores (PERRAIS; VERAN; MULLE, 2010; SOTO *et al.*, 2014; WILLIAMS, 1997). Dentre as subunidades dos receptores cainato, podemos destacar as GluK1, GluK2 e GluK3 são sensíveis à modulação alostérica negativa realizada pelas PA (BOWIE; MAYER, 1995; BURNASHEV *et al.*, 1995). Por fim, tem sido mostrado que as PA são moduladoras alostéricas positivas de NMDAr e, conseqüentemente, podem exercer efeitos sobre a memória; sendo o qual iremos discutir a seguir.

2.4.1 POLIAMINAS E RECEPTORES NMDA

As PA podem exercer importantes funções no SNC através da modulação de canais iônicos ativos por glutamato e possuem papel fundamental no processo de evocação de memória através dos mecanismos mediados via NMDAr. Nesse sentido, diversas evidências confirmam que as PA podem atuar, como moduladoras alostéricas positivas, nos NMDAr (BENVENISTE; MAYER, 1993; DURAND *et al.*, 1992; LERMA, 1992; MCGURK; BENNETT; ZUKIN, 2006; ROCK; MACDONALD, 1992; WILLIAMS, 1994; WILLIAMS *et al.*, 1990), este efeito se dá através da estabilização do lobo inferior do NTD dos dímeros GluN1/GluN2B em um estado conformacional ativo (MONY *et al.*, 2011). Nestes estudos, foi observado que o efeito modulatório da espermina nos NMDAr pode ser dependente da variação no potencial de membrana, pH intracelular e concentrações de agonistas e co-agonistas. Dentre estes efeitos, podemos destacar: Primeiro, chamado de efeito glicina-dependente, o efeito facilitador dos NMDAR na presença do co-agonista glicina (BENVENISTE;

MAYER, 1993; MCGURK; BENNETT; ZUKIN, 2006; WILLIAMS *et al.*, 1994), e aumento da afinidade das subunidades GluN2A ou GluN2B para seu co-agonista glicina. Segundo, chamado efeito glicina-independente, é o aumento no tamanho da corrente mediada via NMDAr por seus respectivos agonistas (glutamato) e co-agonistas (glicina) (BENVENISTE; MAYER, 1993; DURAND *et al.*, 1992; LERMA, 1992; MORGENTALER, 2015; ROCK; MACDONALD, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1990). Em outras palavras, as PA podem aumentar a corrente iônica nos NMDAR, através da atenuação da inibição por prótons, sendo correspondente por cerca de 40-50% da inibição total das correntes glutamatérgica mediada via NMDAr em pH fisiológico. (SULLIVAN *et al.*, 1994; TRAYNELIS; HARTLEY; HEINEMANN, 1995b). Entretanto, vale ressaltar que estes efeitos são considerados subunidade dependente, ou seja, os receptores que são responsivos a este efeito são os que contém os dímeros GluN1/GluN2B (Figura X) (WILLIAMS *et al.*, 1994; WILLIAMS, 1995; ZHANG *et al.*, 1994).

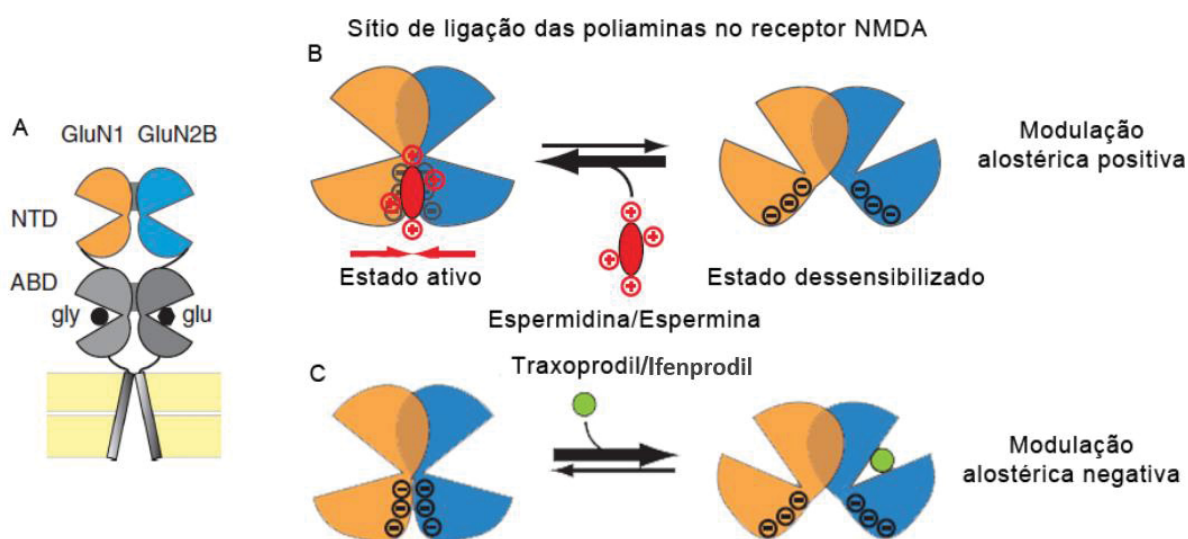


Figura 8. Sítios de modulação alostérica no NMDAr. A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. Adaptado de Mony *et al.*, (2011).

Uma vez que os NMDAr possuem um papel importante nos processos de memória e aprendizado junto ao fato que as PA podem modular estes receptores, diversos estudos investigaram os efeitos destas moléculas em tarefas de memória em modelos animais. De fato, tem sido revisado por GUERRA; RUBIN; MELLO (2016) que as poliaminas podem melhorar o desempenho de roedores em tarefas de

memória, mesmo variando as vias de administração entre intrahipocampal, sistêmica ou intra-amígdala (CAMERA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2010; GUERRA *et al.*, 2006; RUBIN *et al.*, 2000, 2001, 2004). Além disto, este efeito foi abolido com a utilização da arcaina, um antagonista do sítio de ligação das poliaminas nos NMDAr, mostrando um envolvimento do sítio de ligação das PA em tais efeitos. Tem sido sugerido que ratos tratados com espermidina e acamprosato, um facilitador do sítio de ligação das PA nos NMDAr, diminui o tempo de reconhecimento a outro rato familiar, além de não alterar o tempo de investigação para um desconhecido (MIKOLAJCZAK *et al.*, 2002), sugerindo assim um papel das poliaminas na melhora da memória social.

2.4.2 POLIAMINAS E EXCITOTOXIDADE

Baseado no supracitado, estudos mostram que as PA podem melhorar o desempenho de ratos em tarefas de memória. Entretanto, em certos contextos, as PA podem estar envolvidas com processo neurotóxicos; bem como, sua utilização pode agravar os prejuízos de memória. De fato, estudos mostram um aumento na concentração de PA em pacientes com doença de Alzheimer em análise pós morte; principalmente em áreas como lóbulo frontal e córtex temporal (INOUE *et al.*, 2013; MORRISON; KISH, 1995). Além disto, tem sido sugerido que a administração do peptídeo β -amiloide em cultura de neurônios pode aumentar os níveis de poliaminas e, conseqüentemente, aumentar a ativação dos NMDAr (YATIN *et al.*, 1999, 2001). Corroborando isto, apesar da administração de espermidina e espermina em ratos saudáveis aumentar a performance de ratos em tarefas de memória, esta mesma utilização em ratos que possuem o peptídeo β -amiloide parece potencializar os efeitos deletérios cognitivos (INOUE *et al.*, 2013). Portanto, sugerindo que o sistema poliaminérgico possa contribuir para processos neurotóxicos mediados via NMDAr.

Nesse sentido, tem sido mostrado um aumento na atividade da enzima ODC, a qual participa aumentando a biossíntese das PA endógenas, no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (BERNSTEIN; MÜLLER, 1995; MORRISON; CAO; KISH, 1998). Sendo que este aumento das PA nestes contextos possivelmente pode ser explicado devido a animais com administração do peptídeo beta-amiloide (modelo para induzir doença de Alzheimer) possuírem uma menor atividade da antizina, enzima que limita a atividade da ODC (MÄKITIE *et al.*, 2010). Nesse sentido, tem sido mostrado que a inibição do sistema poliaminérgico, seja pela arcaina,

diminuindo a biossíntese com DFMO, antagonizando as subunidades GluN2B com traxoprodil, atenua os prejuízos de memória em camundongos com β -amiloide (Gomes et al., 2014). Interessantemente, a facilitação deste mesmo sistema com administração de espermina pode agravar tais déficits de memória. Portanto, estes achados mostram que as PA podem gerar desfechos mnemônicos opostos de acordo com o contexto do protocolo experimental, seja agravando os prejuízos de memória, ou atenuando-os.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 105 camundongos Swiss machos, com massa corporal entre 25-35 g, originários do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os animais foram mantidos em caixas sob condições padronizadas (temperatura de 22 ± 2 °C; ciclo claro/escuro de 12 h, luz das 07:00 as 19:00 h) com comida e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os camundongos permaneceram por um período de 7 dias que antecedem o experimento no laboratório para que ocorra a habituação ao novo ambiente. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o número 7125070220.

3.2 DROGAS

Decanoato de Nandrolona (Deca-durabolin (4-oestren-17 β -ol-3-one-17-decanoato), espermina (N-[3-aminopropyl]-1,4-butanediamine trihydrochloride) foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA) ou Organon Corporation, (São Paulo, SP, Brasil) e ifenprodil (α -(4-hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidineethanol, 2R,3R-dihydroxybutanedioate (2:1)) foi comprado da Cayman (Ann Arbor, MI, USA). O decanoato de nandrolona foi diluído em um volume de 5 ml/kg de óleo de amendoim administrados via subcutânea (s.c.), enquanto, espermina e ifenprodil serão preparados com uma solução salina (0,9%NaCl) para administração intraperitoneal (i.p.) em um volume de 5 ml/kg com objetivo de se administrar metade da massa corporal para cada animal com o objetivo de diminuir o estresse crônico dos

animais devido a elevado volume administrado em várias exposições. As doses utilizadas no presente estudos são supra fisiológicas e foram escolhidas para mimetizar as doses utilizadas por humanos de forma recreativa sem acompanhamento médico.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL

3.3.1 Tarefa de reconhecimento de objetos novos

A tarefa de reconhecimento de objetos novos foi utilizada com o objetivo de avaliar a memória declarativa de roedores. É considerada um teste comportamental que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais um objeto novo em comparação a um objeto familiar; em um contexto já conhecido pelo animal. Essa maior preferência por objetos novos é considerada um indicativo de que o objeto familiar existe na memória (ENNACEUR, 2010). Dentro desta tarefa de memória, foi utilizado como índice de memória a diferença no tempo de exploração de um objeto familiar, para com um novo.

A tarefa foi realizada em uma caixa de madeira com dimensões de 30x30x30 cm com paredes pintadas de preto, parede frontal feita de acrílico e o chão coberto com folha de acetato de vinil etílico. Além disto, foi fornecida constante iluminação, de 40 lux através de uma lâmpada localizada 60 cm acima do aparelho comportamental. O aparelho foi limpo com álcool etílico 30% antes e imediatamente após o espaço ser ocupado por cada camundongo. Os objetos utilizados foram tijolos plásticos de montagem, cada um com diferentes formas e cores, porém mesmo tamanho. A tarefa consiste em uma sessão de habituação, uma de treino e uma de teste, cada uma com a duração de 8 minutos. O tempo explorando o objeto familiar e o objeto novo foi cronometrado e calculado o escore de discriminação.

Habituação: Os animais foram habituados, por 8 min, ao aparato comportamental sem a introdução de objetos, depois foram retornados às suas gaiolas.

Treinamento: Durante a sessão de treino os animais foram expostos a dois objetos iguais, com devido tempo de exploração sendo mensurado. Foi considerado exploração quando o animal inclinar o nariz em relação ao objeto a menos de 2cm, indicando o ato de cheirar o objeto. Outras manifestações motoras, como morder e subir sobre o objeto não foram considerados como exploração.

Teste: Após serem divididos aleatoriamente entre os grupos do protocolo experimental, foi iniciado a fase de teste. 24h após o treino, os animais foram novamente colocados no aparato comportamental e um dos objetos familiares foi

substituído por um objeto novo. Foi mensurado o tempo de exploração de ambos objetos e, calculado o índice de discriminação com base na fórmula descrita a seguir, o qual foi utilizado como parâmetro de memória. A análise do tempo de exploração de cada objeto foi realizada por meio de um avaliador às cegas do protocolo experimental.

$$\left(\frac{T_{\text{novo}} - T_{\text{familiar}}}{T_{\text{novo}} + T_{\text{familiar}}}\right) * 100 (\%)$$

3.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Após a realização do reconhecimento de objetos novos, foi iniciada imediatamente o teste do labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987). O teste labirinto em cruz elevado é um procedimento com o objetivo de avaliar comportamento ansiolítico e ansiogênico de roedores, devido a tendência natural destes animais em evitar áreas abertas (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). O aparato é consistido em quatro braços de mesmas dimensões que se diferem em certos aspectos. Sendo que dois braços de sentido vertical e perpendiculares em relação a outros dois braços horizontais. Além disto, os braços abertos possuem a finalidade de explorar as características inatas dos camundongos de evitar locais abertos. Os braços fechados possuem uma parede com bordas de vidro de 1 cm de dimensão com e o labirinto é elevado a uma altura de 50 cm do solo. Por fim, o labirinto possui uma área central na cor branca e formato quadrado de 10 cm² que provem acesso livre para cada um dos quatro braços do aparato.

No início do procedimento, o animal foi posicionado no centro do labirinto em cruz elevado com a face voltada para o braço aberto do aparato, oposto a localização do experimentador e capacidade de explorar livremente o labirinto por 5min. Entrada em um dos braços é definida quando o animal realizar a entrada no braço com todas as patas ao interior. A avaliação do procedimento foi realizada pelo pesquisador após o procedimento com auxílio das filmagens realizadas por uma câmera de celular sobreposta acima do aparato, de forma que consiga capturar todo o aparato comportamental. A análise das filmagens e, posterior, foi realizada por meio de um avaliador às cegas do protocolo experimental. Foi avaliado as seguintes variáveis, número total de entrada nos braços abertos, razão do tempo de permanência nos braços abertos pelo tempo de permanência nos braços fechados. Ao início do teste e

antes de qualquer animal posterior ser testado, o aparato comportamental foi devidamente limpo com solução de álcool 30%. O procedimento foi realizado em uma sala com devida iluminação.

3.3.3 Subida de escada

O aparato de treinamento utilizado no experimento foi desenvolvido inicialmente segundo GROSSMAN et al., (1997) que com o tempo, algumas modificações ocorreram em seu design inicial (DUNCAN; WILLIAMS; LYNCH, 1998). O aparelho utilizado possui 100 cm de altura, 20 cm de largura. No topo do aparato, foi colocada uma caixa de medidas 20 x 20 x 20 cm com as paredes pintadas de preto, a fim de proporcionar uma melhor adaptação dos animais ao aparato. A escada possui uma inclinação de 80 ° e 1,5 cm de espaço entre cada degrau, diferente da inicial proposta de 85° e 2 cm de espaçamento de degraus, com esta nova inclinação e menor espaçamento favoreceu uma boa adaptação para os animais realizarem o exercício proposto dinamicamente. Uma semana antes do início da intervenção, os animais passaram por pesagem individual, bem como a adaptação para subir a escada vertical. O procedimento adotado para a aprendizagem no presente estudo sofreu algumas adaptações devido ao protocolo original ser realizado com ratos. Nesse sentido devido à utilização de camundongos neste estudo, entendemos que foram necessárias algumas adaptações no aprendizado para subir a escada.

A adaptação foi realizada em quatro sessões, cada uma sendo realizada em um dia, vinte e quatro horas após sendo realizada a sessão de aprendizagem subsequente.

1 – O animal primeiramente foi colocado na caixa do topo do aparato por 5 minutos.

2 – O animal então foi colocado para subir 33 cm de distância ao topo e realizou a subida na escada até a caixa, a qual foi permitido que ele continuasse lá por 3 minutos.

3 – O animal foi colocado para subir 66 cm de distância ao topo e realizou a subida na escada até a caixa, a qual foi permitido que ele continuasse lá por 3 minutos.

4 – O animal foi colocado para subir 100 cm de distância ao topo e realizou a subida na escada até a caixa, a qual foi permitido que ele continuasse lá por 3 minutos.

Após o término da sessão de adaptação, o teste de força máximo foi realizado 24 horas após a sessão de aprendizagem. Cada animal foi devidamente mensurado a massa corporal com auxílio de uma balança com precisão de centésimos de grama (Sf-400) e foram devidamente posicionados na base da escada com uma carga de 80%, utilizando de chumbos de pesca, da massa corporal presa no rabo. Para cada tentativa realizada com sucesso a carga foi adicionada com 4gr até a realização de uma tentativa falha, sendo anotada a carga anterior com sucesso. Para cada tentativa o aparato e caixa foram limpos com álcool 30%. Foi utilizado para análise estatística apropriada a carga máxima levantada em uma subida em que o animal conseguiu chegar até a caixa preta no topo do aparato.

3.3.4 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi conduzido no aparato de reconhecimento de objetos novos na sessão de habituação, o objetivo foi verificar se os tratamentos do presente estudo alteram a atividade locomotora dos animais (WALSH; CUMMINS, 1976) no contexto em que foi realizado o aparato de memória e, sendo conduzido de acordo com HALL (1934). A tarefa foi realizada em uma caixa de madeira com dimensões de 30x30x30 cm com paredes pintadas de preto, parede frontal feita de acrílico e o chão coberto com folha de acetato de vinil etílico. Além disto, foi fornecida constante iluminação, cerca de 40 luxes através de uma lâmpada localizada 60 cm acima do aparelho comportamental. A temperatura da sala foi mantida em cerca de 22°. Cada animal foi colocado no centro do aparato e permitido a percorrer livremente durante todo o teste sem quaisquer objetos dentro do aparato. O teste foi filmado com auxílio de uma câmera de celular fixada superiormente ao aparato. Foi utilizado o software Any Maze® com o objetivo de dividir o aparato em duas linhas perpendiculares, formando quatro quadrantes, e mensurar o número de cruzamentos em linha que cada animal realizou em uma duração de 8 minutos de teste como parâmetro de atividade locomotora. A análise das filmagens e, posterior, foi realizada por meio de um avaliador às cegas do protocolo experimental. O aparelho foi limpo com álcool etílico 30% antes e imediatamente após o espaço ser ocupado por cada camundongo.

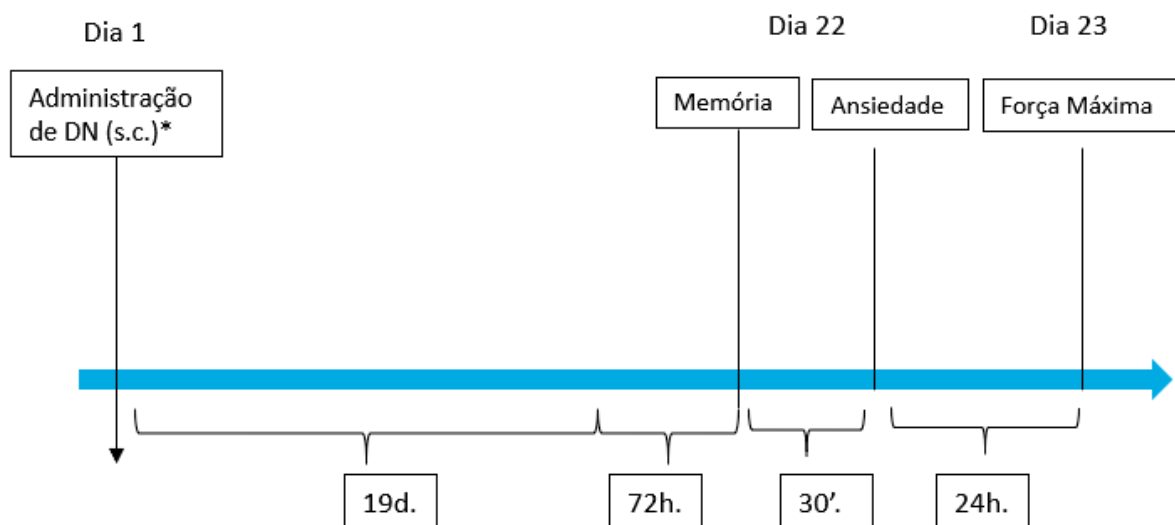


Figura 9. Desenho experimental geral. Administração prolongada de DN durante 19 dias, realizada a cada três dias. Após 25 horas da última exposição os animais foram habituados, treinados e testados no aparato reconhecimento de objetos, sendo que cada fase possui 24 horas de intervalo. Trinta minutos após a realização do teste reconhecimento de objetos, os animais foram testados no labirinto em cruz elevado. Finalmente, 24 horas após a realização do aparato de ansiedade, os animais foram testados na subida de escada.

*Ou óleo de amendoim, dependendo do grupo experimental.

3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Efeito da administração prolongada de decanoato de nandrolona sobre a performance no teste de memória de reconhecimento de objeto

O objetivo deste experimento foi avaliar a administração prolongada de decanoato de nandrolona causa prejuízo sobre a memória de animais no teste de memória de reconhecimento de objeto. Os animais foram tratados com decanoato de nandrolona (5, 15 ou 50 mg/kg), doses selecionadas de acordo com estudos prévios (CLARK; MITRE; BRINCK-JOHNSEN, 1995b; MAGNUSSON *et al.*, 2009c; SMITH; STACKMAN; CLARK, 1996), ou óleo de amendoim, por via subcutânea (s.c.) durante 19 dias, a cada três dias, e foram habituados no aparato comportamental. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram habituados, treinados, e 24h após foram testados para avaliar o índice de discriminação conforme descrito anteriormente. Com base no cálculo do índice de discriminação, foi verificado se a administração prolongada de DN altera a performance no teste de memória de reconhecimento de objeto.

3.4.2 Envolvimento do receptor NMDA no efeito induzido pelo decanoato de nandrolona na performance no teste de memória de reconhecimento de objeto

O objetivo deste experimento foi avaliar o envolvimento do receptor NMDA no efeito da DN sobre a performance no teste de reconhecimento de objetos. Os animais foram tratados por via subcutânea com DN (dose com efeito *per se* baseado na curva de dose), ou por via intraperitoneal de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.), ou a combinação das duas drogas. Dose selecionada baseado em estudos prévios (Fruhauf et al., 2015), durante 19 dias, a cada três dias. Vinte quatro horas após a última exposição, os animais foram habituados e treinados no aparato de reconhecimento de objetos como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram testados no aparato comportamental e o índice de discriminação foi avaliado como descrito anteriormente.

3.4.3 Efeito da coadministração de espermina e ifenprodil sobre o efeito induzido pelo decanoato de nandrolona na performance no teste de memória de reconhecimento de objeto

Para confirmar o envolvimento da subunidade NR2B, do receptor NMDA, no efeito do DN sobre a performance no teste de memória de reconhecimento de objetos. Os animais foram tratados por via subcutânea com DN (dose com efeito *per se* baseado na curva de dose), ou por via intraperitoneal de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.), ou espermina (0,1 mg/kg i.p.), ou a combinação de duas ou mais drogas, durante 19 dias, a cada três dias. Os experimentos em que os animais são coadministrados com ambas drogas, foi padronizado que espermina foi administrada 30 minutos antes de ifenprodil. Dose selecionada baseado em estudos prévios (Frühauf et al., 2015; Tomazi et al., 2017). Vinte quatro horas após a última exposição, os animais foram habituados e treinados no aparato de reconhecimento de objetos conforme descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após o treino os animais foram testados no aparelho comportamental e o índice de discriminação foi avaliado como descrito anteriormente.

3.4.4 Efeito da administração de decanoato de nandrolona sobre parâmetros de ansiedade

O objetivo deste experimento foi avaliar se a administração de DN altera parâmetros de ansiedade. Os animais foram tratados com decanoato de nandrolona (5, 15 ou 50 mg/kg), ou óleo de amendoim, por via subcutânea (s.c.) durante 19 dias, a cada três dias. Setenta e duas horas após a última exposição os foram testados no labirinto em cruz elevado, 30 minutos após a realização do teste de reconhecimento de objetos, os animais foram testados no teste labirinto em cruz elevado conforme descrito anteriormente com objetivo de verificar alterações na ansiedade. Foi avaliado como parâmetro de ansiedade as variáveis descritas anteriormente. Com base no cálculo, foi avaliado se a administração de decanoato de nandrolona altera o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado.

3.4.5 Efeito da administração de decanoato de nandrolona na atividade locomotora

O objetivo deste experimento foi avaliar se a administração de DN altera a atividade locomotora. Os animais foram tratados com decanoato de nandrolona (5, 15 ou 50 mg/kg), ou óleo de amendoim, por via subcutânea (s.c.) durante 19 dias, a cada três dias. Vinte e quatro horas após a última exposição, os animais foram testados no campo aberto, na fase de habituação da tarefa de reconhecimento de objetos para verificar alterações na atividade locomotora com o tratamento. Foi mensurada a atividade locomotora de acordo com as variáveis descritas anteriormente. Com base no cálculo, foi avaliado se a administração de decanoato de nandrolona altera a atividade locomotora no teste de campo aberto.

3.4.6 Efeito da administração de decanoato de nandrolona sobre a força máxima

O objetivo deste experimento foi avaliar se a administração de DN altera a força máxima de camundongos na subida de escada. Os animais foram testados na subida de escada no período pré-tratamento. Posteriormente, os animais foram administrados de forma prolongada, durante 19 dias a cada três dias, por via subcutânea (s.c.), decanoato de nandrolona (DN) 15 mg/kg. Noventa e seis horas após a última exposição de DN, os animais foram testados na subida de escada. Foi avaliada a força máxima de acordo com as variáveis descritas anteriormente. Com

base no cálculo, foi avaliado se a administração de decanoato de nandrolona altera a força máxima no teste de subida de escada.

3.4.7 Efeito administração de decanoato de nandrolona sobre a massa corporal

O objetivo deste experimento foi avaliar se a administração de DN altera a massa corporal. Os animais avaliados a massa corporal no período pré-tratamento com uma balança digital. Posteriormente, os animais foram administrados de forma prolongada, durante 19 dias, por via subcutânea (s.c.), salina e decanoato de nandrolona (DN) 15 mg/kg. Noventa e seis horas após a última exposição de DN, os animais foram testados na balança digital para verificar alteração na massa corporal no período pós tratamento. Foi avaliada a massa corporal de camundongos ao longo do protocolo experimental, sendo o período pré tratamento antes da administração de DN, e o período pós tratamento 94 horas após a última exposição. Com base nas variáveis descritas anteriormente foi avaliado se a administração de decanoato de nandrolona altera a massa corporal.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett-Box para verificar a homogeneidade das variâncias junto ao teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk para verificar a normalidade, sendo utilizado o primeiro para experimentos que contém mais de 30 animais e o segundo para experimentos com número amostral inferior a 30. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via nos experimentos que envolvem apenas o fator esteroide (decanoato de nandrolona ou veículo). Duas vias nos experimentos que envolvem os fatores esteroide (decanoato de nandrolona ou veículo) e antagonista da subunidade GluN2B (ifenprodil ou salina). Ou três vias nos experimentos que envolvem os fatores supracitados em conjunto com agonista da subunidade GluN2B (espermina ou salina). Também foi realizada a análise de variância de medidas repetidas de duas vias nos desfechos de força máxima e massa muscular no período do tratamento estudado, a fim de encontrar diferenças no tratamento. A análise *post hoc* foi realizada pelo teste de Dunnett para comparações múltiplas com o grupo controle nos experimentos de curva de dose resposta, bem como teste de Bonferroni para comparações múltiplas em todos os grupos utilizado

nos experimentos de reversão e reversão da reversão. Além disto, para dados não paramétricos foi utilizada o teste de Kruskal Wallis e quando obtida significância estatística, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para diferenças entre os grupos. Os valores serão considerados significantes quando $p < 0,05$ e os resultados serão expressos como média \pm erro médio padrão para dados paramétricos, e mediana e intervalos interquartis para dados não paramétricos.

4 RESULTADOS

4.1 Decanoato de nandrolona prejudica a performance no teste de memória de reconhecimento de objetos novos.

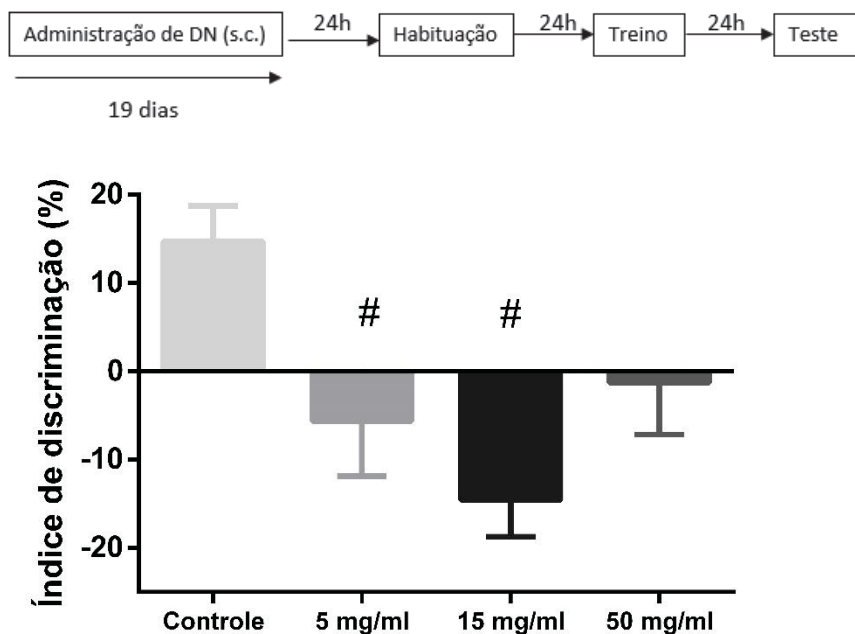


Figura 10. Administração prolongada de decanoato de nandrolona prejudica a performance no teste de memória de reconhecimento de objetos novos. Camundongos foram administrados com decanoato de nandrolona (5,15 ou 50mg/kg) ou veículo (óleo de amendoim) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após foram habituados, treinados e posteriormente testados a fim de verificar a performance de memória no aparato de reconhecimento de objetos novos. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle através da análise *one-way* ANOVA e post hoc de Dunnett. Dados estão representados por média+ erro padrão do índice de discriminação na sessão de teste ($n = 5-7$ animais, em cada grupo).

A Figura 10 mostra o efeito da administração prolongada de DN (5,15 ou 50mg/kg) ou óleo de amendoim (controle) a cada três dias, durante 19 dias na performance de memória no teste de reconhecimento de objetos. Análise estatística (*one-way* ANOVA) do índice de discriminação no teste revelou um efeito significativo do tratamento $F_{(3,21)} = 5,93$; $P < 0,005$. O teste de Dunnett revelou que as doses de 5 e 15mg/kg apresentaram diferenças significativas no índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objetos para o grupo controle. Esse resultado sugere que a administração prolongada de DN prejudica a performance no teste de reconhecimento de objetos.

4.2 Ifenprodil previne o prejuízo de memória induzido pela administração de decanoato de nandrolona

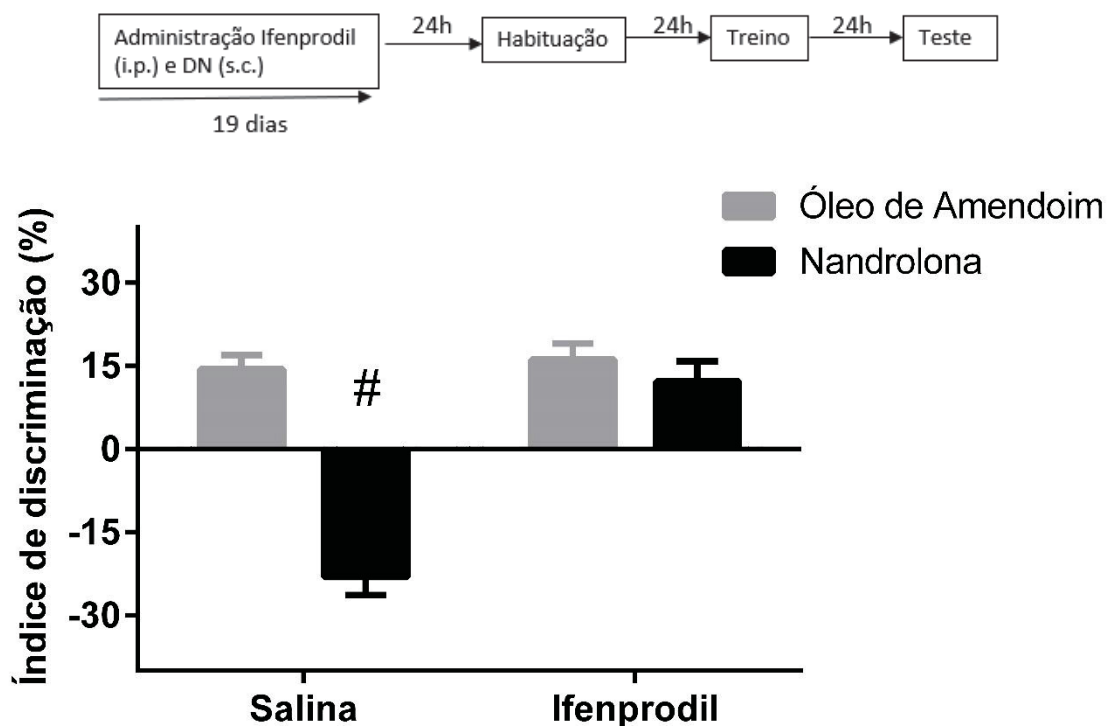


Figura 11. Administração prolongada de ifenprodil previne o prejuízo de memória induzido por decanoato de nandrolona no teste de memória de reconhecimento de objetos novos. Camundongos foram administrados com ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) ou solução salina 0,9% e/ou decanoato de nandrolona (15 mg/kg s.c.) ou veículo (óleo de amendoim s.c.) a cada três dias, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após foram habituados, treinados e posteriormente testados a fim de verificar a performance de memória no aparato de reconhecimento de objetos novos. # $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle através da análise de *two-way* ANOVA e post hoc de Bonferroni. Dados estão representados por média+ erro padrão do escore de preferência na sessão de teste ($n = 7-9$ animais, em cada grupo).

A Figura 11 mostra que a administração prolongada de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) previne o efeito da administração prolongada de DN (15 mg/kg) a cada três dias, durante 19 dias na performance de memória no teste de reconhecimento de objetos. Análise estatística (*two-way* ANOVA) do índice de discriminação no teste reconhecimento de objetos revelou uma interação significativa entre os fatores decanoato de nandrolona e ifenprodil $F_{(1,26)} = 26,87$; $P < 0,0001$. A análise post hoc de Bonferroni revelou que os índices de discriminação na presença de esteroide e antagonista GluN2B (DN e ifenprodil, respectivamente) não apresentam diferenças

significativas para o grupo ausência de esteroide e antagonista GluN2B (DN e ifenprodil, respectivamente). Entretanto, o grupo presença de esteroide (DN) e ausência de antagonista GluN2B (ifenprodil), apresenta diferença significativa para com os outros grupos. Esse resultado sugere que a administração prolongada de ifenprodil previne o prejuízo na performance do teste reconhecimento de objetos induzido pela administração prolongada de DN.

4.3 Espermina reverte parcialmente o efeito protetor do ifenprodil

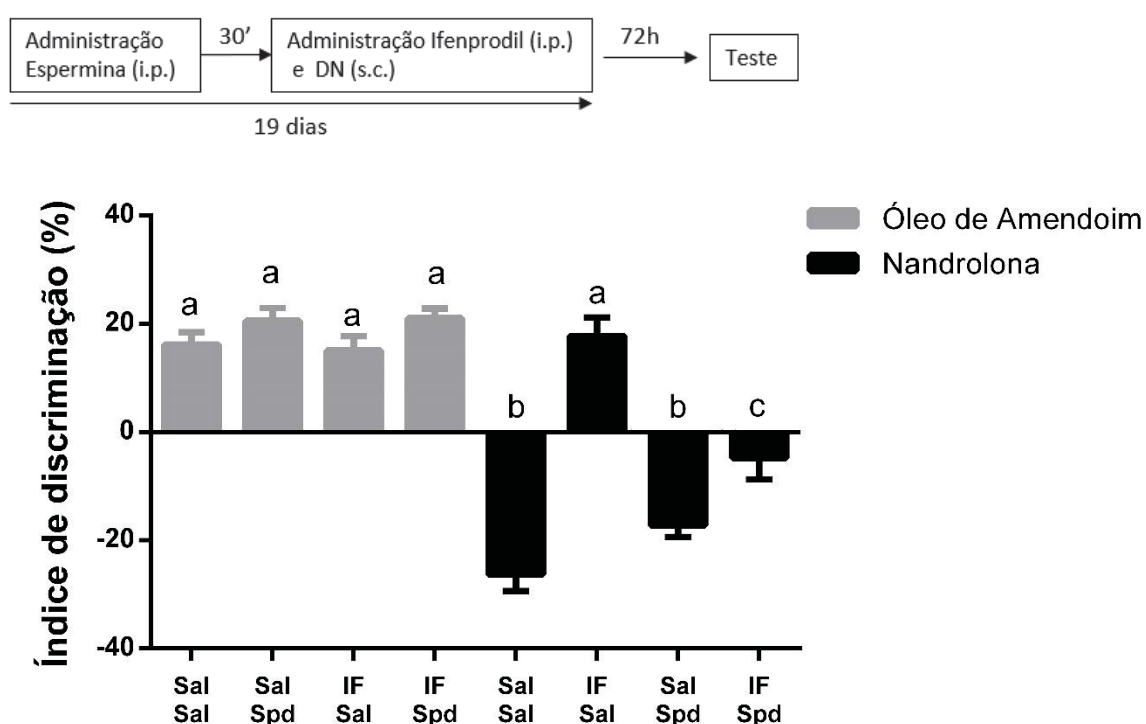
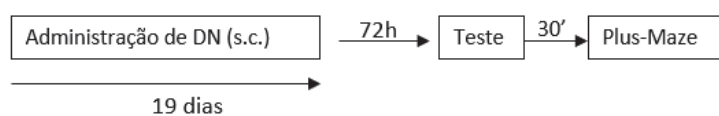


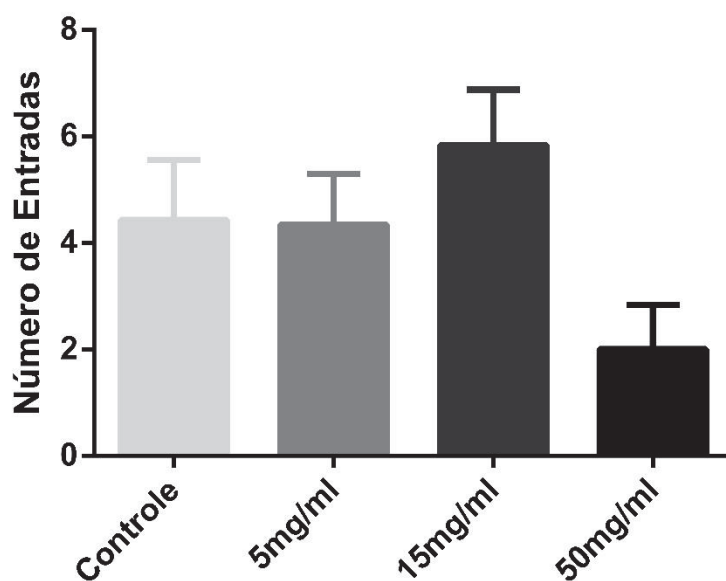
Figura 12. Espermina reverte a prevenção de memória induzida pela coadministração prolongada de ifenprodil e decanoato de nandrolona no teste de memória de reconhecimento de objetos. Camundongos foram coadministrados com espermina (0,1 mg/kg) trinta minutos antes de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) ou solução salina 0,9% e/ou decanoato de nandrolona (15 mg/kg s.c.) ou veículo (óleo de amendoim s.c.) a cada três dias, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após foram habituados, treinados e posteriormente testados a fim de verificar a performance de memória no aparato de reconhecimento de objetos novos. Letras diferentes indicam diferenças significativas encontradas na análise *three-way* ANOVA ($p < 0,05$) e post hoc de Bonferroni. Dados estão representados por média+ erro padrão do índice de discriminação na sessão de teste ($n = 6$ animais, em cada grupo).

A Figura 12 mostra que a administração prolongada de espermina (0,1 mg/kg i.p.) reverte parcialmente a prevenção de memória induzida por ifenprodil (0,3 mg/kg). A análise estatística (*three-way ANOVA*) do índice de discriminação revelou interação significativa entre os fatores presença de decanoato de nandrolona, espermina e ifenprodil $F_{(1,32)} = 9,13$; $P = 0,005$; *Effect Size*: 0,22. A análise post hoc de Bonferroni revelou efeito significativo dos índices de discriminação dos grupos presença de esteroide, antagonista e agonista GluN2B (DN, ifenprodil e espermina, respectivamente) para com o grupo presença de esteroide e antagonista GluN2B (DN, ifenprodil, respectivamente) e ausência de agonista GluN2B (espermina). Esse resultado sugere que os três fatores modificam o efeito do outro, em outras palavras, a administração de espermina reverte parcialmente o efeito protetor realizado pelo ifenprodil.

4.4 Decanoato de nandrolona altera a ansiedade de camundongos no teste de labirinto em cruz elevado



A



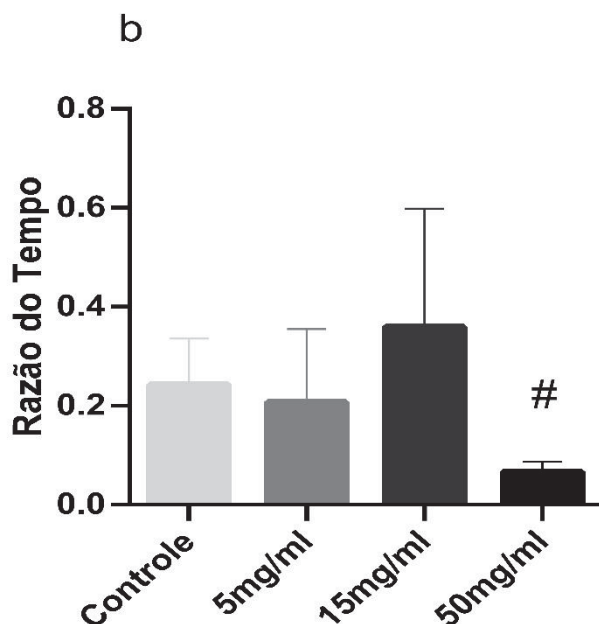
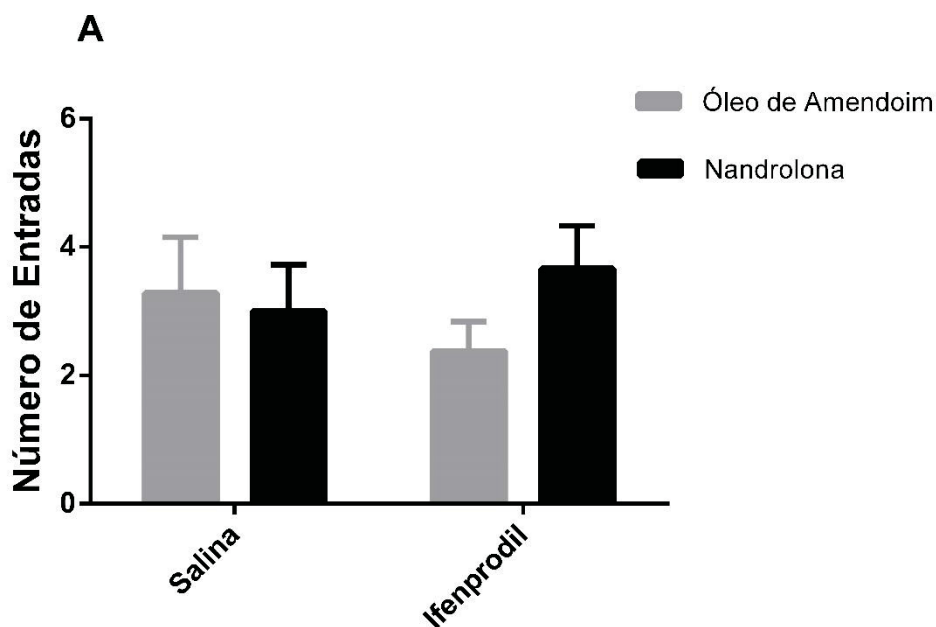
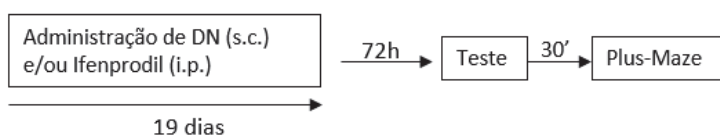


Figura 13. Administração prolongada de decanoato de nandrolona altera a ansiedade de animais no teste de labirinto em cruz elevado. Camundongos foram administrados com decanoato de nandrolona (5,15 ou 50mg/kg) ou veículo (óleo de amendoim) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Setenta e duas horas após os animais foram testados a fim de verificar alteração na ansiedade no aparato labirinto em cruz elevado. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle através do teste de Mann-Whitney. A - Dados estão representados por média+ erro padrão do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. B - Dados estão representados por mediana e intervalo interquartil da razão do tempo de permanência no braço aberto e fechado no labirinto em cruz elevado ($n = 6-7$ animais, em cada grupo).

É mostrado na Figura 13 que a administração prolongada de DN (50 mg/kg) a cada três dias, durante 19 dias altera a ansiedade de animais no teste de labirinto em cruz elevado. A análise estatística (*one-way* ANOVA) do número de entradas nos braços abertos (Figura 13 A) não apresentou efeito significativo no tratamento com DN em comparação ao grupo controle (óleo de amendoim) $F_{(3,20)} = 2,11$; $P > 0,05$. Entretanto, análise estatística (Kruskall-Wallis) da razão de tempo (Figura 13 B) revelou um efeito significativo na dose de 50 mg/kg em comparação ao grupo controle (óleo de amendoim) ($K = 8,76$; $P < 0,05$). O teste de Mann-Whitney revelou um efeito significativo do grupo 50 mg/kg em comparação ao grupo controle (óleo de amendoim) ($U = 6,5$; $P < 0,05$). Entretanto, o teste de Mann-Whitney não apresentou efeito significativo dos grupos 15 mg/kg ($U = 12$; $P > 0,05$) e 5 mg/kg ($U = 20$; $P > 0,05$) em comparação ao grupo controle (óleo de amendoim). Esse resultado sugere que a administração de DN altera

o comportamento ansioso apenas na dose de 50 mg/kg. Nesse sentido, a dose DN utilizada no presente estudo para a tarefa de reconhecimento de objetos foi a dose de 15 mg/kg, a qual não apresentou efeito *per se* sobre ansiedade. Portanto os efeitos observados no teste de reconhecimento de objetos não podem ser atribuídos a uma alteração neste estado interoceptivo do animal na tarefa.

4.5 Decanoato de nandrolona e ifenprodil não alteram a ansiedade de camundongos



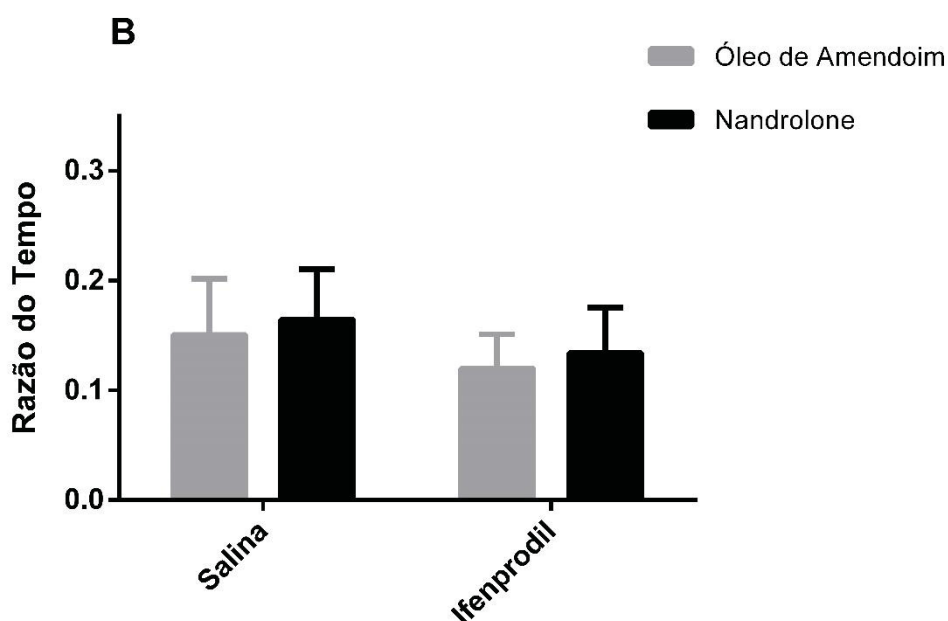


Figura 14. Administração prolongada de decanoato de nandrolona e ifenprodil não altera a ansiedade de camundongos no labirinto em cruz elevado. Camundongos foram administrados por 19 dias com decanoato de nandrolona (15 mg/kg) e/ou ifenprodil (0,3 mg i.p.) a cada três dias. Setenta e duas horas após, foram testados no labirinto em cruz elevado, realizado 30 minutos após o teste de reconhecimento de objetos, para obtenção para obtenção do número de entradas nos braços abertos (A) e da razão entre tempo de permanência no braço aberto e fechado (B) a fim de verificar quaisquer alterações na ansiedade com o tratamento experimental. Dados estão representados por média e erro padrão do número de entradas e razão do tempo no labirinto em cruz elevado.

De acordo com a figura 14 é mostrado que a administração prolongada de DN (15 mg/kg) e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg) não alteram o número de entradas e a razão de tempo de camundongos no labirinto em cruz elevado. Análise estatística (*two-way* ANOVA) do número de entradas (Figura 14 A) não revelou interação entre os fatores $F_{(1,26)} = 1,32$; $P > 0,05$, bem como efeito principal dos tratamentos antagonista $F_{(1,26)} = 0,53$; $P > 0,05$; *Effect Size* = 0,001; e do tratamento esteroide $F_{(1,26)} = 0,77$. Em adição, análise estatística (*two-way* ANOVA) da razão de tempo (Figura 14 B) não revelou interação entre os fatores $F_{(1,27)} = 1,55$; $P > 0,05$, bem como efeito significativo do tratamento antagonista GluN2B (ifenprodil) $F_{(1,26)} = 0,10$; $P > 0,05$; e do tratamento esteroide (DN) $F_{(1,26)} = 0,50$; $P > 0,05$. Esse resultado sugere que a administração prolongada de DN e ifenprodil, ou somente um dos tratamentos não alteram a ansiedade de animais no labirinto em cruz elevado.

4.6 Decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a ansiedade de camundongos

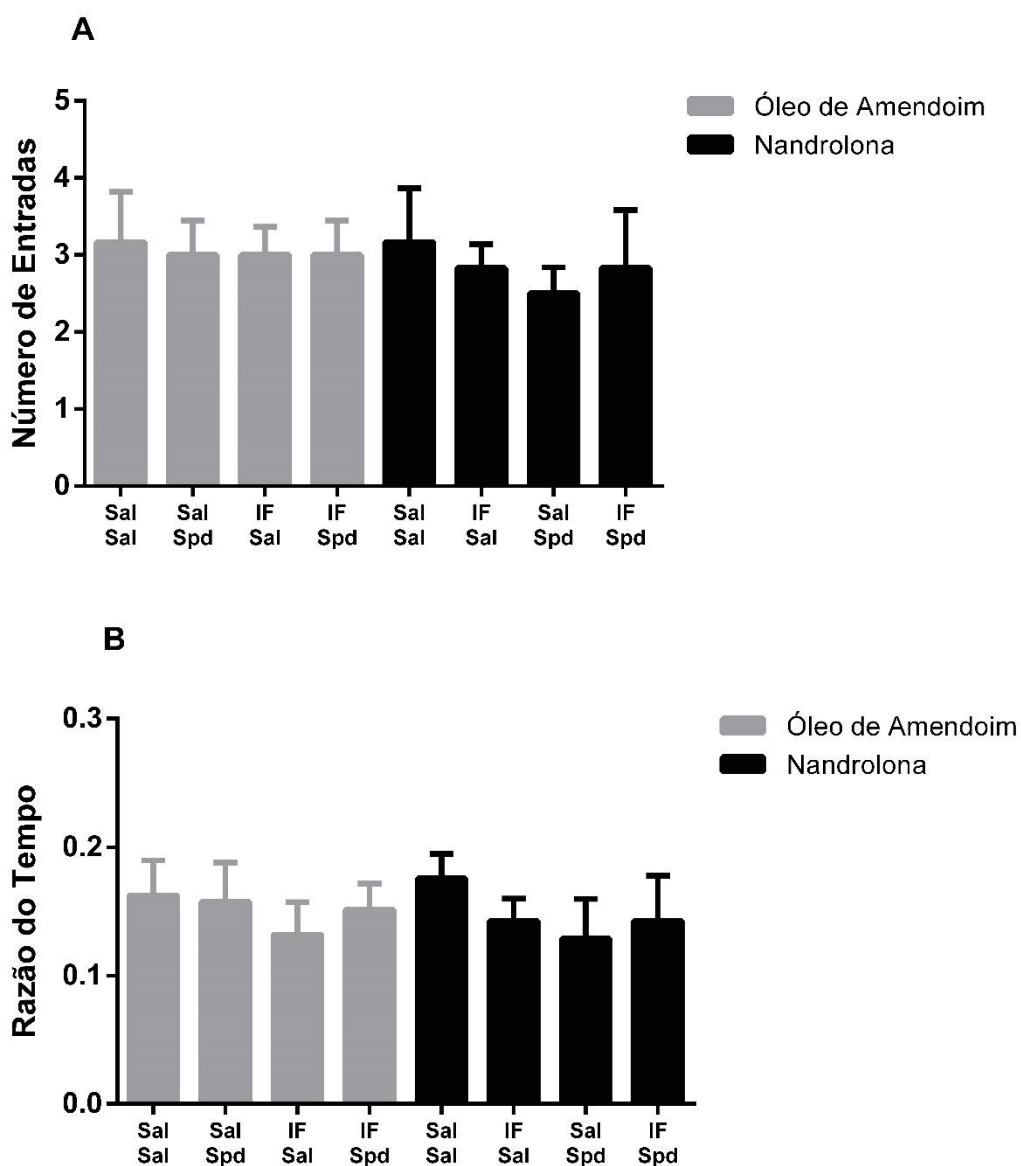
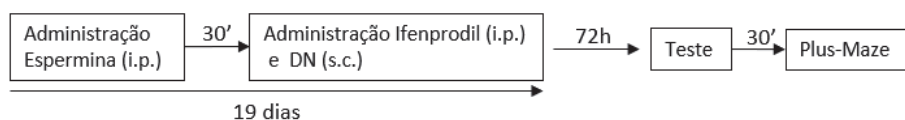


Figura 15. Administração prolongada de decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a ansiedade de camundongos no labirinto em cruz elevado. Camundongos foram coadministrados com espermina (0,1 mg/kg) trinta minutos antes de ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) ou solução salina 0,9% e/ou decanoato de nandrolona (15 mg/kg s.c.) ou veículo (óleo de amendoim s.c.) a cada três dias, durante 19 dias de experimento. Trinta minutos após o aparato de reconhecimento de objetos novos, os animais

foram testados no labirinto em cruz elevado para obtenção do número de entradas nos braços abertos (A) e razão entre tempo de permanência no braço aberto e fechado (B) a fim de verificar quaisquer alterações na ansiedade com o tratamento experimental. Dados estão representados por média+ erro padrão do índice de discriminação na sessão de teste (n = 6 animais, em cada grupo).

A figura 15 mostra que a administração prolongada de espermina e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg) e/ou DN (15 mg/kg) a cada três dias, não altera o número de entradas e a razão de tempo no labirinto em cruz elevado. A análise estatística (*three-way ANOVA*) não revelou interação significativa entre os fatores decanoato de nandrolona, espermina e ifenprodil do número de entradas (Figura 15 A) $F_{(1,32)} = 0,324$; $P > 0,05$; bem como da razão do tempo de permanência no braço aberto pelo fechado (Figura 15 B) $F_{(1,32)} = 0,271$; $P > 0,05$. Além disto, não foi revelado efeito significativo do fator nandrolona no número de entradas [$F_{(1,32)} = 0,324$; $P > 0,05$] e na razão de tempo [$F_{(1,32)} = 0,479$; $P > 0,05$]. Também não foi revelado efeito significativo do fator ifenprodil no número de entradas [$F_{(1,32)} = 0,241$; $P > 0,05$], e na razão de tempo [$F_{(1,32)} = 2,606$; $P > 0,05$], e finalmente do fator espermina ifenprodil no número de entradas [$F_{(1,32)} = 0,719$; $P > 0,05$], e na razão de tempo [$F_{(1,32)} = 0,152$; $P > 0,05$]. Esse resultado sugere que a administração de espermina, ifenprodil e DN não alteram o comportamento ansioso de camundongos, bem como os três fatores não modificam o efeito dos outros na ansiedade.

4.7 Decanoato de nandrolona não altera a atividade locomotora de camundongos

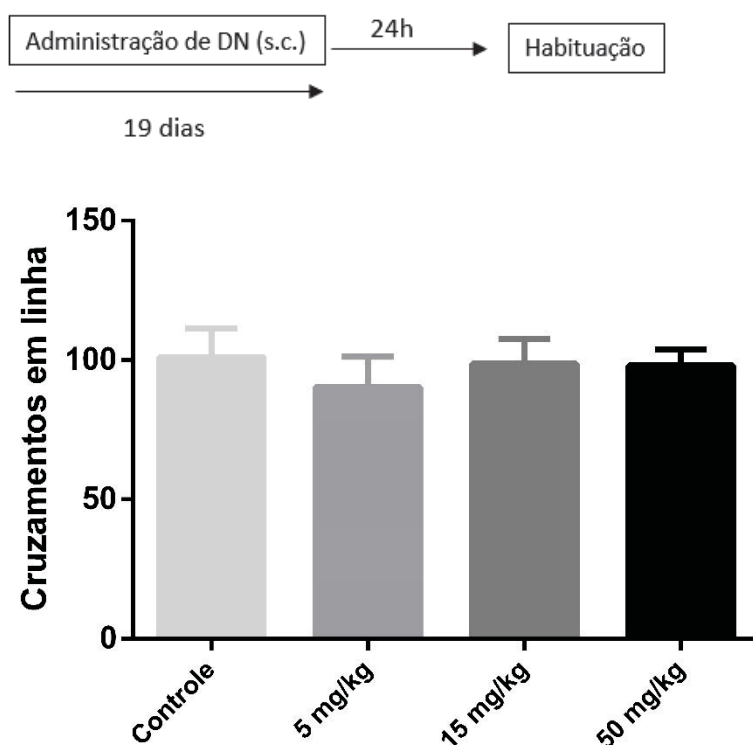


Figura 16. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto. Camundongos foram administrados com decanoato de nandrolona (5, 15 ou 50 mg/kg) ou veículo (óleo de amendoim) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após, os animais serão submetidos a fase de habituação, como um teste de campo aberto, a fim de verificar alteração na atividade locomotora. Dados estão representados por média + erro padrão do número de cruzamentos no teste de campo aberto.

De acordo com a Figura 16 é mostrado que a administração prolongada de DN (5, 15 e 50 mg/kg) a cada três dias, durante 19 dias não altera a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto. Análise estatística (*one-way ANOVA*) do número de cruzamentos não apresentou efeito significativo do tratamento em comparação ao grupo controle (óleo de amendoim) $F_{(3,21)} = 0.24$; $P > 0,05$. Esse resultado sugere que a administração prolongada de DN não altera a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto.

4.8 Decanoato de nandrolona e ifenprodil não alteram a atividade locomotora de camundongos

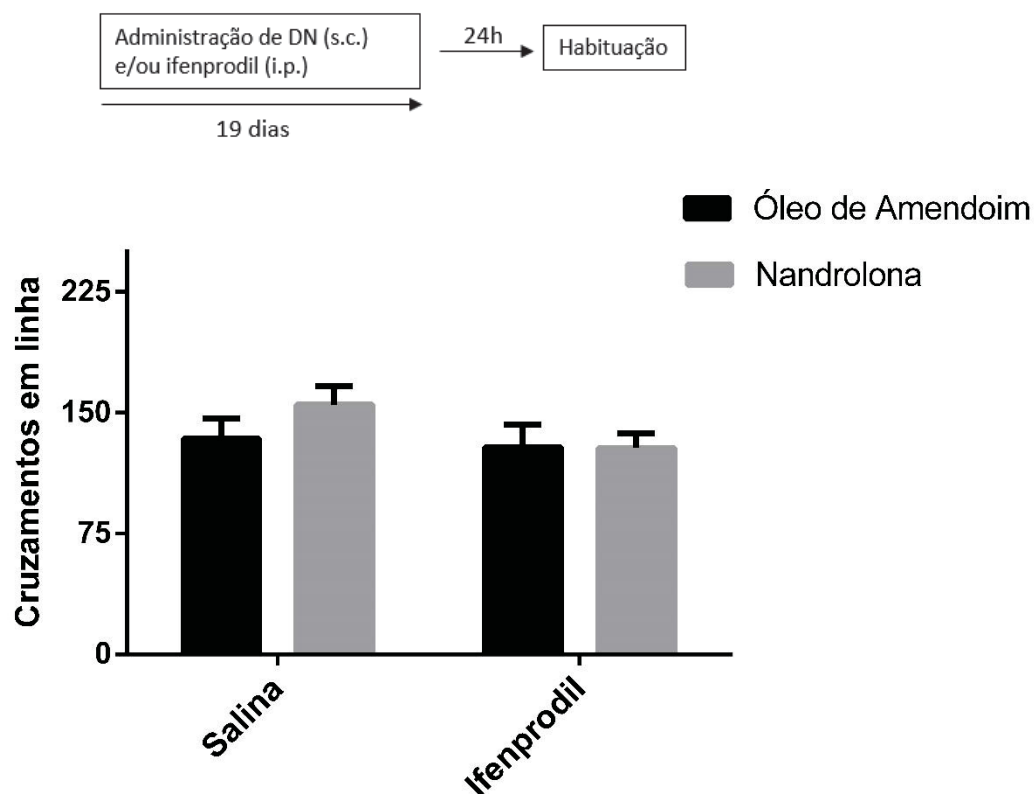


Figura 17. Administração prolongada de decanoato de nandrolona e/ou ifenprodil não alteram a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto. Camundongos foram administrados com decanoato de nandrolona (15 mg/kg s.c.) e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após, os animais serão submetidos a fase de habituação, como um teste de campo aberto, a fim de verificar alteração na atividade locomotora. Dados estão representados por média+ erro padrão da distância total percorrida no teste de campo aberto.

De acordo com a Figura 17 é mostrado que a administração prolongada de DN (15 mg/kg) e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg) a cada três dias, durante 19 dias não altera a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto. Análise estatística (*two-way ANOVA*) do número de cruzamentos não apresentou interação entre os fatores $F_{(1,27)} = 0,81$; $P < 0,05$, bem como não relevou efeito significativo dos tratamentos antagonista (ifenprodil) $F_{(1,27)} = 0,28$; $P < 0,05$; e tratamento esteroide (DN) $F_{(1,27)} = 0,021$; $P < 0,05$. Esse resultado sugere que a administração prolongada de DN e/ou ifenprodil não alteram a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto.

4.9 Decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a atividade locomotora de camundongos

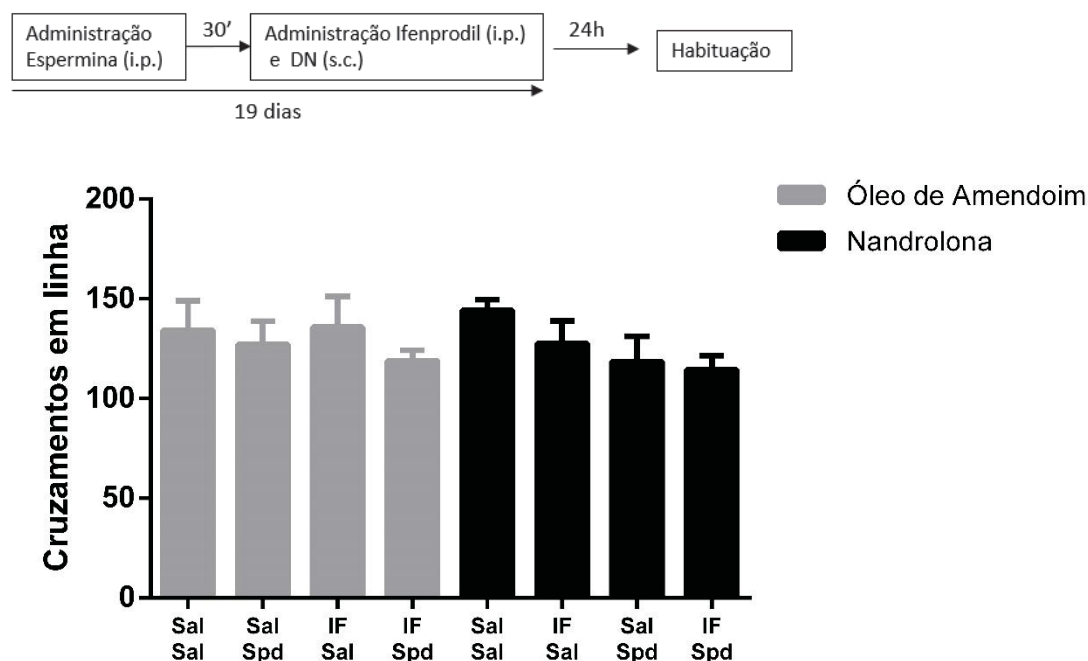


Figura 18. Administração prolongada de decanoato de nandrolona, ifenprodil e espermina não alteram a atividade locomotora de camundongos no teste de campo aberto. Camundongos foram coadministrados com espermina (0,1 mg/kg) e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg i.p.) ou solução salina 0,9% e/ou decanoato de nandrolona (15 mg/kg s.c.) ou veículo (óleo de amendoim s.c.) a cada três dias, durante 19 dias de experimento. Vinte e quatro horas após a última administração de decanoato de nandrolona, os animais foram testados no campo aberto para obtenção do número de cruzamentos a fim de verificar quaisquer alterações na atividade locomotora com o tratamento experimental. Dados estão representados por média+ erro padrão do número de cruzamentos no teste de campo aberto (n = 6 animais, em cada grupo).

A figura 18 mostra que a administração prolongada de espermina e/ou ifenprodil (0,3 mg/kg) e/ou DN (15 mg/kg) a cada três dias, não altera o número de cruzamentos no teste de campo aberto. A análise estatística (*three-way* ANOVA) do número de cruzamentos não revelou interação significativa entre os fatores decanoato de nandrolona, espermina e ifenprodil $F_{(1,32)} = 0,07$; $P > 0,05$. Além disto, não foi revelado um efeito significativo do fator decanoato de nandrolona $F_{(1,32)} = 0,749$ $P > 0,05$; do fator ifenprodil $F_{(1,32)} = 0,471$; $P > 0,05$; e finalmente no fator espermina $F_{(1,32)} = 0,043$; $P > 0,05$. Esse resultado sugere que a administração de espermina, ifenprodil e DN não alteram a atividade locomotora de camundongos, bem como não um fator não modifica o efeito dos outros fatores na atividade locomotora.

4.10 Decanoato de nandrolona não altera a força máxima de camundongos

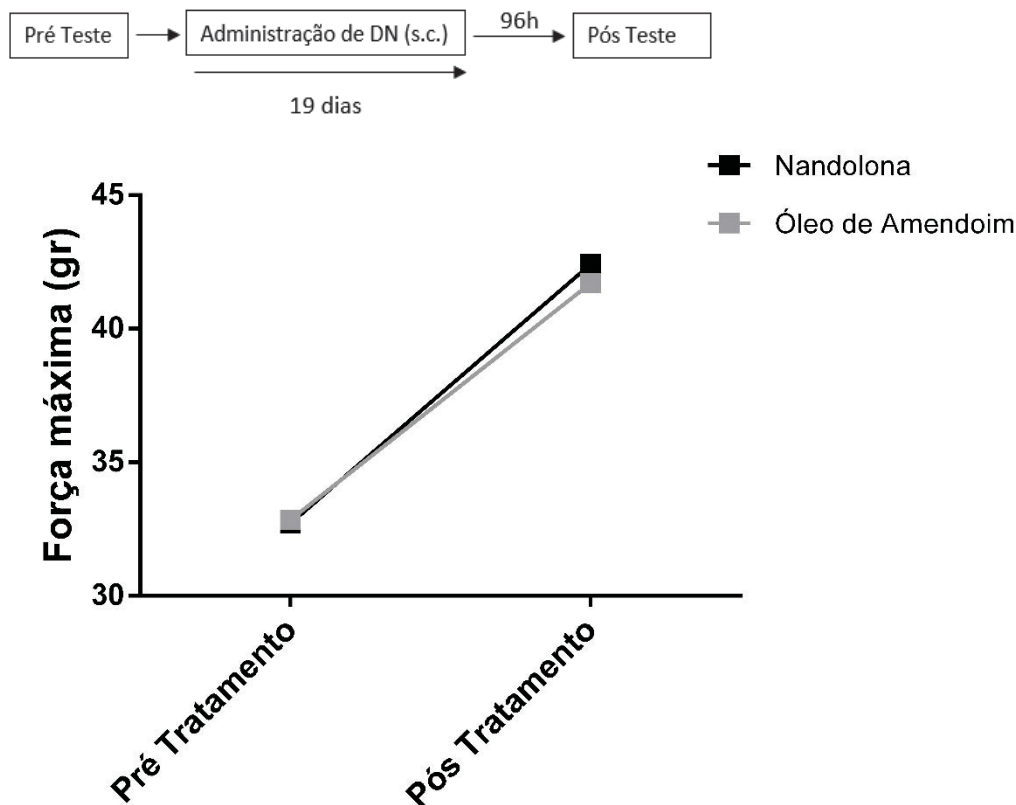


Figura 19. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a força máxima de camundongos no aparato de subida de escada. Camundongos foram testados no aparato de subida de escada para obtenção dos escores de força máxima pré-tratamento; após, foi realizada a administração prolongada de DN (15 mg/kg s.c.) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Noventa e seis horas após, os animais foram testados novamente no aparato de subida de escada a fim de verificar alteração na força máxima. Dados estão representados por média da força máxima no teste de subida de escada.

A figura 19 mostra que a administração prolongada de DN (15 mg/kg) não altera a força máxima de camundongos na subida de escada no período pré-tratamento e pós tratamento. Análise estatística (*two-way ANOVA-repeated measures*) da força máxima levantada no período experimental não apresentou interação significativa entre os fatores decanoato de nandrolona e período de tratamento $F_{(1,27)} = 0,68$; $P > 0,05$. Entretanto, foi revelado um efeito significativo do período pré e pós tratamento na força máxima no aparato subida de escada $F_{(1,27)} = 183,5$; $P < 0,001$. Esse resultado sugere que embora os animais aumentem sua força máxima no período de 23 dias de tratamento, esse aumento não é causado devido à utilização de DN.

4.11 Decanoato de nandrolona não altera a massa corporal de camundongos

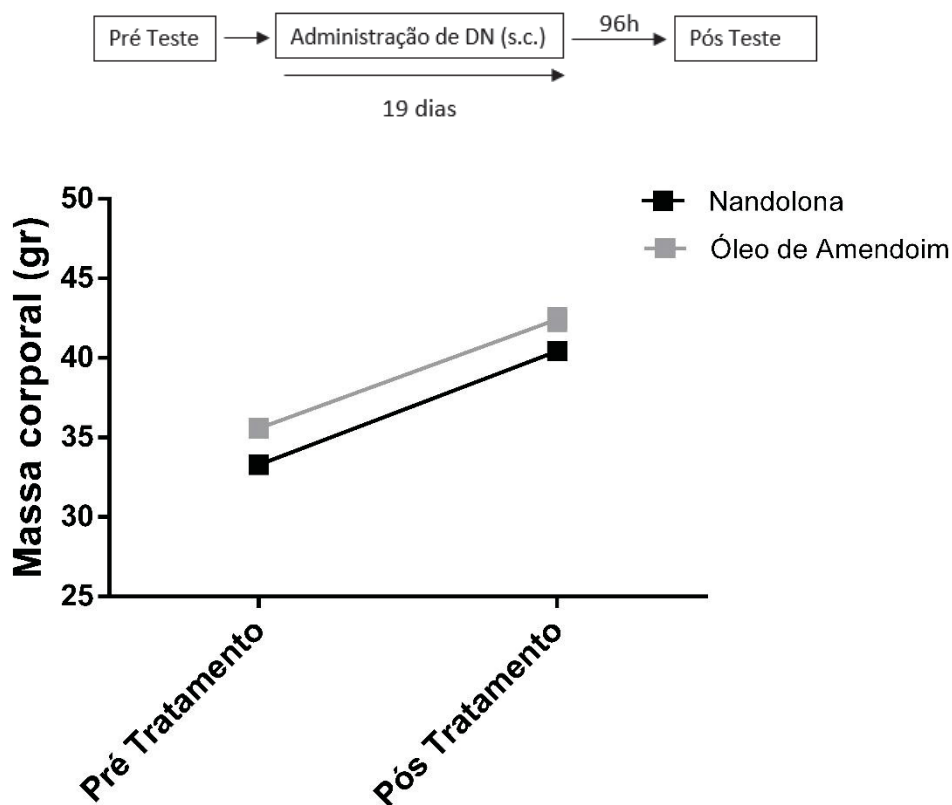


Figura 20. Administração prolongada de decanoato de nandrolona não altera a massa corporal de camundongos. Camundongos foram pesados para obtenção da massa corporal pré-tratamento; após, foi realizada a administração prolongada de DN (15 mg/kg s.c.) a cada terceiro dia, durante 19 dias de experimento. Noventa e seis horas após, os animais foram pesados novamente a fim de verificar alteração na massa corporal. Dados estão representados por média da massa corporal.

De acordo com a figura 20 a administração de DN não alterou a massa corporal de camundongos no período pré-tratamento e pós tratamento. Análise estatística (*two-way ANOVA-repeated measures*) da massa corporal não revelou interação do tratamento decanoato de nandrolona e período de tratamento $F_{(1,27)} = 0,10$; $P < 0,05$. Todavia, foi revelado efeito significativo do período experimental na massa corporal dos camundongos $F_{(1,27)} = 624,52$; $P < 0,0001$. Esse resultado sugere que embora a massa corporal aumente nos períodos do tratamento, a administração de DN não é responsável por tal efeito.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que: 1) a administração prolongada de DN prejudica a performance na tarefa de reconhecimento de objetos em camundongos; 2) o efeito deletério da administração prolongada de DN (15 mg/kg) foi prevenido pela coadministração de ifenprodil; 3) o efeito do ifenprodil foi parcialmente revertido pela administração de espermina; 4) o DN administrado de forma prolongada na dose de 50 mg/kg tem efeito ansiogênico, enquanto o ifenprodil e a espermina não apresentam tal efeito; 5) as administrações prolongada de DN, ifenprodil e espermina não alteram a atividade locomotora e 6) a administração prolongada de DN (15 mg/kg) não altera a força máxima e a massa corporal de camundongos.

Nossos resultados mostram que a administração prolongada de DN (5 e 15 mg/kg) prejudica a performance de memória de camundongos no aparato reconhecimento de objetos e, estão de acordo com estudos prévios da literatura que mostram que a exposição de animais a DN (15 mg/kg s.c.), de forma crônica, prejudica a memória espacial e de trabalho (KOUVELAS *et al.*, 2008; MAGNUSSON *et al.*, 2009b). De forma aguda, a administração de duas doses de DN (73 e 219 mM i.c.v.) prejudicam a aquisição da memória no aparato esquiiva passiva (ZAREI *et al.*, 2018), e a consolidação da memória no labirinto radial (KARAMIAN *et al.*, 2014). Nossos resultados apontam que a administração de DN, em dose mais elevada (50 mg/kg), não apresenta efeito sobre a performance no teste de reconhecimento de objetos. Nesse sentido, estudos suportam que os EAA, incluindo a DN, podem apresentar efeitos bifásicos na memória (KARAMIAN *et al.*, 2014; ZAREI *et al.*, 2018), o que explica o fato da maior dose do presente estudo não apresentar o mesmo efeito que doses inferiores.

Além disso, estudos prévios mostram que a administração de um coquetel de EAA (ND, testosterona e derivados) não apresenta prejuízo sobre a performance de ratos no teste de labirinto aquático de Morris (CLARK; MITRE; BRINCK-JOHNSEN, 1995a; SMITH; STACKMAN; CLARK, 1996). Tem sido sugerido que a DN pode sofrer menor ação da enzima aromatase e, conseqüentemente, ser convertida em menor magnitude em estrogênio em comparação a testosterona (KURLING-KAILANTO *et al.*, 2010; MOTTRAM; GEORGE, 2000). De fato, a literatura suporta possíveis efeitos neuroprotetores do estrogênio (KOYUNCUOĞLU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2014), sua deficiência relacionado à perda de memória (PANDEY *et al.*, 2020), bem como

revisões mostram a associação aos processos de aprendizagem, memória e neurogênese (DUARTE-GUTERMAN *et al.*, 2015). Portanto, sugere-se que a utilização de EAA com diferentes características farmacológicas nos protocolos experimentais, possam interferir no efeito sobre a performance na tarefa de memória estudada. Recentemente foi mostrado por Salimi e colaboradores (2019) que uma única exposição intracerebroventricular de micro dose de DN (60 µg por rato i.c.v.) pode melhorar a memória. Esta divergência possivelmente pode ser explicada devido ser improvável que uma única exposição de DN, em dose fisiológica, irá desencadear excitotoxicidade mediada via ativação glutamatérgica, e prejudicar a memória de animais conforme protocolos mais prolongados.

A administração de ifenprodil preveniu o prejuízo de memória induzido pela DN na tarefa de reconhecimento de objetos. O ifenprodil é um antagonista dos NMDAr que possui 100 vezes mais seletividade para a subunidade GluN2B (WILLIAMS, 1993), e liga-se a interface N-terminal dos dímeros GuN1/GluN2B (BHATT *et al.*, 2013). Além disto, evidências mostram que o ifenprodil pode aumentar a sensibilidade por prótons de receptores que contém as subunidades GluN1/GluN2b (MOTT *et al.*, 1998; PAHK; WILLIAMS, 1997; WHITTEMORE *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2001), restringir a mudança do receptor para um estado conformacional ativo e atenuar a probabilidade de abertura dos canais (BHATT *et al.*, 2013). De fato, um estudo demonstrou que as arquiteturas dos lobos do NTD da subunidade GluN2B se alteram conformacionalmente com a presença de ifenprodil para um estado fechado (KARAKAS; SIMOROWSKI; FURUKAWA, 2011), representando um estado funcional inibido. Tem sido mostrado por cristalografia de raios X, crio-microscopia eletrônica de partícula única e eletrofisiologia que o ifenprodil altera o estado conformacional das estruturas que compõem o NTD dos dímeros GluN1/GluN2B do NMDAr. Na presença de ifenprodil: 1) ocorre um fechamento da estrutura bi-lóbica da subunidade GluN2B em ~20°; 2) uma aproximação no lobo superior GluN1 em encontro do lobo inferior GluN2B; e 3) um rearranjo que envolve uma rotação de ~15° de uma subunidade em direção a outra (TAJIMA *et al.*, 2016), sendo que estas alterações conformacionais são essenciais para a inibição da condutância elétrica observadas na presença de ifenprodil. Em outras palavras, devido a ligação do antagonista os NMDAr permanecem com os canais iônicos fechados mesmo na presença de glutamato. Além disso, no pH fisiológico, cerca de 50% dos NMDAr que contém GluN2B são inibidos (MONY *et al.*, 2009b; TRAYNELIS; HARTLEY; HEINEMANN, 1995b), diminuindo a

formação de correntes iônicas mediadas via NMDAr, que contém os dímeros GluN1/GluN2B.

Interessantemente, a DN pode aumentar a fosforilação das subunidades GluN2A e GluN2B (ROSSBACH *et al.*, 2007b) do receptor NMDA, facilitar a transmissão glutamatérgica e elevar os níveis de glutamato (KALININE *et al.*, 2014). Além disto, já está bem estabelecido na literatura que o aumento excessivo de Ca^{2+} mediados via NMDAr está relacionado com processos neurodegenerativos (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003; BEZPROZVANNY, 2009; PCHITSKAYA; POPUGAEVA; BEZPROZVANNY, 2018; VELASCO, 2011) e degradação de proteínas quinases envolvidas no processo de aprendizado e memória (TRINCHESE *et al.*, 2008; VOSLER; BRENNAN; CHEN, 2008). Nesse sentido, de acordo com evidências que mostram uma maior ativação glutamatérgica induzida pela DN; o ifenprodil previne o déficit de memória induzido pela DN, e que o ifenprodil é um antagonista seletivo para subunidades GluN2B dos NMDAr, pode-se sugerir que a ativação anormal das subunidades GluN2B é responsável pelo déficit de memória em protocolos prolongados de exposição à DN. Entretanto, tem sido proposto recentemente que em protocolo agudo o mecanismo do prejuízo na evocação de memória induzido por DN envolve a proteína fosfatase calcineurina (MORADPOUR *et al.*, 2019). Entretanto, é possível que em protocolos prolongados possa haver um mecanismo adaptativo quanto ao prejuízo na plasticidade sináptica reportado por MORADPOUR e colaboradores, (2019). Sugerindo que processos crônicos estão mais envolvidos em tais prejuízos cognitivos, como por exemplo mecanismos apoptóticos.

Nossos resultados mostram que espermina reverte parcialmente o efeito protetor de ifenprodil no prejuízo, induzido por DN, na performance do teste de reconhecimento de objetos. Estes achados se encontram em acordo com estudo prévio da literatura que mostrou que em contextos de elevada excitotoxicidade, mediada via NMDAr, a facilitação do sistema poliaminérgico pode agravar os prejuízos de memória induzido pelo peptídeo β -amiloide, bem como a prevenção do prejuízo de memória foi realizada por antagonistas seletivos GluN2B, como traxopodil (GOMES *et al.*, 2014). Além disto, tem sido apontado que devido à administração do peptídeo β -amiloide, ocorre uma maior biossíntese de poliaminas (GOMES *et al.*, 2010; INOUE *et al.*, 2013; YATIN *et al.*, 1999) e prejuízo de memória, no qual a inibição desta síntese pode atenuar tais déficits de memória. Interessantemente, a literatura suporta efeitos

neurotóxicos da administração prolongada de DN (BRÄNNVALL *et al.*, 2005; CARACI *et al.*, 2011; ORLANDO *et al.*, 2007). Consequentemente, não se pode descartar a hipótese de que a administração prolongada de DN possa aumentar a biossíntese das poliaminas, sendo estas responsáveis pela maior facilitação dos NMDAr que contém a subunidade GluN1/Glu2B. Tem sido proposto que as poliaminas podem alterar o estado conformacional dos domínios NTD, das subunidades GluN1/GluN2B, de dessensibilizado, induzido pelo antagonista, a um estado conformacional ativo. De fato, no estado ativo os NTD das subunidades GluN1 e GluN2B se encontram abertos conformacionalmente e se aproximam até ficarem intimamente associadas. Em outras palavras, as poliaminas podem aliviar a repulsão eletroestática entre a protonação encontrada na interface do NTD destes dímeros, aproximando e estabilizando as subunidades em um estado mais sensibilizado ao glutamato (MONY *et al.*, 2011). Por fim, uma vez que ifenprodil pode se ligar a outro receptor além dos NMDAr, tais como receptores alfa-1-adrenérgicos (CHENARD *et al.*, 1991; YOUNG *et al.*, 1981), nossos achados contribuem para uma maior evidência da participação das subunidades GluN2B no efeito deletério de DN na performance do teste de reconhecimento de objetos, visto que mostram que espermina reverteu parcialmente o efeito protetor de ifenprodil.

Nossos achados que mostram que a administração prolongada de espermina reverte parcialmente o efeito do ifenprodil, no déficit de memória, estão de acordo com estudos prévios da literatura que descrevem uma interação negativa entre o sítio de ligação das poliaminas no NMDAr e o sítio de ligação para o ifenprodil (KEW; KEMP, 1998). Nesse sentido, as mudanças conformacionais induzidas pelas poliaminas podem interferir na ligação do ifenprodil na subunidade GluN2b visto que tem-se sugerido que a ligação do ifenprodil na interface dos dímeros desta subunidade requer uma mudança conformacional do domínio NTD (BURGER *et al.*, 2012; KARAKAS; SIMOROWSKI; FURUKAWA, 2011; KEW; TRUBE; KEMP, 1996).

Nossos achados mostram que a administração subcutânea de DN (50 mg/kg s.c.), apresenta efeito ansiogênico em camundongos. Nossos resultados estão em acordo com estudos prévios que mostram que a administração crônica de DN aumenta a ansiedade em ratos, visto que diminuem o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (JOKSIMOVIC *et al.*, 2019; ROSIC *et al.*, 2014; SELAKOVIC *et al.*, 2017). Além disto, El-Shamarka e colaboradores (2020) mostram que a administração crônica de DN, realizada todos os

dias na dose de 15 mg/kg, durante um mês, causa aumento da ansiedade através da diminuição do tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Entretanto, nossos resultados não mostram efeito ansiogênico de DN (5 e 15 mg/kg s.c.). Esta diferença possivelmente pode ser explicada devido ao menor tempo de duração do protocolo experimental e à frequência de exposição do animal à droga no presente estudo. De fato, uma vez que nos estudos citados anteriormente o protocolo experimental envolve administrações de DN por períodos mais prolongados e frequência de administração mais elevada e, considerando o tempo de meia vida de DN, 8 dias em humanos (SINGH *et al.*, 2014), logo em roedores este tempo seria ligeiramente menor, entretanto ainda sim pode-se ser caracterizado como um fármaco de elevada meia vida. Nesse sentido, é possível que o animal seja exposto a concentrações superiores de DN, em comparação a mesma dose utilizada no presente trabalho. Portanto, é possível que o efeito ansiogênico da DN se dê devido a diferenças em relação ao procedimento experimental.

O mecanismo pelo qual a DN pode aumentar a ansiedade não está bem descrito na literatura. É mostrado que enquanto a DN pode aumentar a transmissão gabaérgica no núcleo ventromedial do hipotálamo, pode inibir na área pré-optica (McCarthy, 1995). Nesse sentido, tem sido mostrado que a inibição da transmissão gabaérgica no hipotálamo estão associadas a respostas comportamentais ansiogênicas (A Shekhar, 1993) no labirinto em cruz elevado. Portanto, é possível que o efeito ansiogênico observado com a administração prolongada de DN seja mediado via alteração na transmissão gabaérgica, sendo necessário estudos que investiguem tais efeitos. Por fim, uma vez que nosso tratamento foi realizado antes do treino e, conseqüentemente, poderia causar alterações ansiogênicas nos animais e com isso alterar o desfecho mnemônico da tarefa de reconhecimento de objetos (MCGAUGH, 2015), foi realizado o labirinto em cruz elevado a fim de escolher uma dose de DN que não apresentasse efeito *per se* na ansiedade dos animais. Entretanto, não se pode descartar interferência de quaisquer outros estados interoceptivos que possam inferir no índice de discriminação.

Nossos achados mostram que a administração prolongada de ifenprodil, DN, espermina ou a combinação de duas ou mais drogas não alteram a ansiedade de camundongos no labirinto em cruz elevado. Entretanto, tem sido mostrado que antagonistas dos NMDAr produzem comportamentos ansiolíticos de animais (Liu et

al., 2009; Salunke, Umathe, & Chavan, 2014; Tonetto, Terzian, Del Bel, Guimarães, & Resstel, 2009; Walia, Garg, & Garg, 2019; Zarrindast, Nasehi, Pournaghshband, & Ghorbani Yekta, 2012), especialmente ifenprodil (MIKOLAJCZAK *et al.*, 2003). Esta diferença, possivelmente, pode ser atribuída a utilização de diferentes doses e tempo de exposição ao ifenprodil no protocolo experimental. Além disto, uma vez que a alteração da ansiedade pode interferir no índice de discriminação da tarefa de reconhecimento de objetos, mesmo não sendo um componente mnemônico do aparato, é importante que as doses de DN (15 mg/kg), ifenprodil (0,3 mg/kg) e espermina (0,1 mg/kg) utilizadas não alterem o comportamento ansioso dos animais, visto que podem interferir na motivação do animal na realização do treino e teste do aparato (MCGAUGH, 2015). Por fim, coerente com a ausência de efeito na ansiedade da administração de ifenprodil na apresentada neste estudo, foi encontrado um tamanho de efeito de 0,001.

Uma vez que a atividade locomotora pode influenciar o índice de discriminação dos animais na tarefa de reconhecimento de objetos, especialmente por não se incluir como um componente mnemônico da tarefa, monitoramos o efeito de nossos tratamentos no número de cruzamentos no campo aberto, como forma de verificação da atividade locomotora dos animais. Uma vez que nossos tratamentos com DN (5, 15 e 50 mg/kg), ifenprodil (0,3 mg/kg) ou espermina (0,1 mg/kg) não alteraram o número de cruzamentos dos animais no teste de campo aberto, os resultados apresentados neste estudo não podem ser associados a alterações na locomoção ou coordenação dos animais. Este achado encontra-se em concordância com estudo de Frühauf *et al.*, (2015) que mostrou que a administração de ifenprodil e espermina não alteram a atividade locomotora de camundongos no campo aberto. Além disso, a literatura mostra-se controversa em relação ao efeito da administração de DN sobre a atividade locomotora em roedores. Enquanto estudos apresentam resultados similares aos presentes achados (SALVADOR *et al.*, 1999), outros mostram que a administração de EAA pode aumentar a atividade locomotora de ratos (VAN ZYL; NOAKES; LAMBERT, 1995).

Ademais, nossos achados mostram que a administração prolongada de DN (15 mg/kg) não altera a força máxima na subida de escada e a massa corporal de camundongos. Apesar da massa corporal ter aumentado significativamente no período pré e pós tratamento, nossos achados não mostram efeito significativo do tratamento no mesmo período. Da mesma forma, tem sido mostrado que a

administração de DN, em pacientes humanos com imobilização de membros inferiores não possuiu efeito na prevenção da perda de força muscular e hipertrofia (HORSTMAN *et al.*, 2019), corroborando nossos achados que mostram uma ausência de efeito da DN na força muscular e hipertrofia em amostras sem realização de estímulo de treinamento. Entretanto, nossos achados são divergentes de Storer e colaboradores (2003) o qual sugere que doses supra fisiológicas de testosterona em humanos podem causar crescimento (15,1% aumento no diâmetro muscular) e aumento de força muscular (17,2% aumento na força muscular de membros inferiores) sem quaisquer estímulo de treinamento. Interessantemente, devido à similaridade nos ganhos de força e diâmetro muscular é sugerido que, mesmo com a falta de estímulo, os ganhos em força foram devido ao aumento de hipertrofia induzido pela administração de testosterona.

Nesse sentido estudos mostram que o ganho de força pode ser obtido com adaptações neurais ao exercício físico que está sendo realizado (SALE, 1988), ou por meio do crescimento muscular, ou seja hipertrofia (LOENNEKE *et al.*, 2019). O treinamento de força pode prover estímulos anabólicos que sinalizam um aumento na síntese proteica, conseqüentemente, aumentando a síntese de proteína muscular e o balanço de síntese e degradação proteica contribuindo favoravelmente para o crescimento e força muscular (PHILLIP, 2009). Dentre estes estímulos pode-se destacar o recrutamento da via de sinalização celular mTORc1/Akt, que regula o processo de tradução proteica. Após a ativação da via mTORc1/Akt outras proteínas quinases como a p70^{S6k} e a proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1), as quais traduzem sinais provindos de mTORc1 contribuem para diversas etapas da síntese proteica (COFFEY; HAWLEY, 2007; PHILLIP, 2009). Além disto, estas adaptações serão específicas ao tipo do estímulo, sendo qual exercício realizado o grande responsável por esta especificidade (IZQUIERDO *et al.*, 2004; MAHONEY *et al.*, 2005). Entretanto, no presente estudo os animais foram adaptados durante quatro dias ao aparato e as cargas que seriam utilizadas como sobrecarga, sendo improvável que se ocorra ganhos neurais após tais sessões. Dessa forma a tarefa proposta não foi suficiente para induzir possíveis adaptações neuromusculares, justificando a ausência de ganhos de força relacionado ao tratamento farmacológico realizado.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que: 1) a administração prolongada de DN prejudica a memória na tarefa de reconhecimento

de objetos; 2) a administração de ifenprodil, antagonista da subunidade GluN2B do receptor NMDA, previne o prejuízo da memória induzido por DN e 3) a administração de espermina, modulador alostérico positivo do receptor NMDA, previne o efeito do ifenprodil. Dessa maneira podemos concluir que o prejuízo de memória induzido por DN parece acontecer devido a adaptações celulares e moleculares mediadas via NMDAR, que contém a subunidade GluN2B. Acreditamos que o prejuízo da memória encontrado envolve uma superexcitabilidade destes receptores, visto que este efeito foi prevenido por ifenprodil. Extrapolando nossos resultados para condições de administrações prolongadas de DN, é possível que a DN pode estar acarretando em um aumento da biossíntese de poliaminas, uma vez que espermina reverteu parcialmente o efeito do ifenprodil sobre o prejuízo de memória induzida por DN, sendo necessários estudos que investiguem o papel do sistema poliaminérgico nos efeitos deletérios induzidos por DN. Por fim, não foi investigado no presente estudo o papel dos receptores androgênicos no aumento da transmissão glutamatérgica via NMDAR, uma vez que não se pode descartar a hipótese que o mecanismo da maior facilitação glutamatérgica seja por uma via *down-stream* à ativação do receptor androgênico, sendo necessários estudos que investiguem se existe tal papel.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou se a administração prolongada de DN causa efeitos deletérios na memória e ansiedade. Bem como, se aumenta a força e massa corporal de camundongos. Foi investigado o papel das subunidades GluN2B dos NMDAR nos prejuízos na performance do teste de reconhecimento de objetos, induzido pela administração prolongada de DN. Concluímos que a administração prolongada de decanoato de nandrolona causa efeitos deletérios na memória de camundongos na tarefa de reconhecimento de objetos. Também é mostrado que este efeito possui participação das subunidades GluN2b receptores N-metil-D-aspartato, devido a prevenção realizada pelo ifenprodil. A reversão do efeito protetor de ifenprodil realizada a administração de espermina, nos fornece mais evidência do papel destas subunidades nos prejuízos induzidos pela DN. Além disto, é possível hipotetizar uma participação das poliaminas nos efeitos deletérios de DN, sendo necessários mais estudos que investiguem tal papel. Foi verificado que a administração prolongada de decanoato de nandrolona apresenta efeito ansiolítico. Entretanto não apresentaram

alterações na ansiedade e atividade locomotora com a administração prolongada de ifenprodil e espermina. Por fim, é mostrado que camundongos tratados por 19 dias com decanoato de nandrolona não tem valores máximos de força muscular e massa corporal alterados em comparação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

AHIMA, Rexford S.; HARLAN, Richard E. Regulation of glucocorticoid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus by andronergic-anabolic steroids. **Brain research**, [S. l.], v. 585, n. 1–2, p. 311–314, 1992.

ALBERT, D. J.; WALSH, M. L.; JONIK, R. H. Aggression in humans: what is its biological foundation? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 405–425, 1993.

ANWAR, Raheel; MATTOO, Autar K.; HANDA, Avtar K. Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. *In: Polyamines*. [S. l.]: Springer, 2015. p. 267–302.

ARUNDINE, Mark; TYMIANSKI, Michael. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, [S. l.], v. 34, n. 4–5, p. 325–337, 2003.

BELLONE, Camilla; NICOLL, Roger A. Rapid Bidirectional Switching of Synaptic NMDA Receptors. **Neuron**, [S. l.], 2007.

BENKE, Tim A. *et al.* Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. **Nature**, [S. l.], v. 393, n. 6687, p. 793, 1998.

BENVENISTE, M.; MAYER, M. L. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. **The Journal of Physiology**, [S. l.], 1993.

BERNSTEIN, Hans Gert; MÜLLER, Michael. Increased immunostaining for l-ornithine decarboxylase occurs in neocortical neurons of Alzheimer's disease patients. **Neuroscience Letters**, [S. l.], 1995.

BEZPROZVANNY, Ilya. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. **Trends in molecular medicine**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 89–100, 2009.

BHASIN, Shalender *et al.* The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 335, n. 1, p. 1–7, 1996.

BHASIN, Shalender; STORER, T. Anabolic applications of androgens for functional limitations associated with aging and chronic illness. *In: Advances in the Management of Testosterone Deficiency*. [S. l.]: Karger Publishers, 2009. v. 37p. 163–182.

BHATT, Jay M. *et al.* Effect of ifenprodil on GluN1/GluN2B N-methyl-D-

aspartate receptor gating. **Molecular pharmacology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 9–21, 2013.

BITO, Haruhiko; DEISSEROTH, Karl; TSIEN, Richard W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺-and stimulus duration–dependent switch for hippocampal gene expression. **Cell**, [S. l.], v. 87, n. 7, p. 1203–1214, 1996.

BLISS, Tim V. P.; COLLINGRIDGE, Graham L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, [S. l.], v. 361, n. 6407, p. 31, 1993.

BLOODGOOD, Brenda L.; GIESSEL, Andrew J.; SABATINI, Bernardo L. Biphasic synaptic Ca influx arising from compartmentalized electrical signals in dendritic spines. **PLoS biology**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. e1000190, 2009.

BLOODGOOD, Brenda L.; SABATINI, Bernardo L. Nonlinear regulation of unitary synaptic signals by CaV2.3 voltage-sensitive calcium channels located in dendritic spines. **Neuron**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 249–260, 2007.

BORGO, Christian *et al.* Protein kinase CK2 potentiates translation efficiency by phosphorylating eIF3j at Ser127. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1853, n. 7, p. 1693–1701, 2015.

BOWIE, Derek; MAYER, Mark L. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. **Neuron**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 453–462, 1995.

BRÄNNVALL, Karin *et al.* 19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 871–878, 2005.

BREUER, Megan E. *et al.* Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. **Hormones and behavior**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 409–418, 2001.

BRODSKY, Irwin G.; BALAGOPAL, P.; NAIR, K. Sreekumaran. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men--a clinical research center study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 81, n. 10, p. 3469–3475, 1996.

BUDAARI, S. **Merck Index 12th Ed. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. [S. l.]: Inc**, 1996.

BURGER, Pieter B. *et al.* Mapping the binding of GluN2B-selective N-methyl-D-aspartate receptor negative allosteric modulators. **Molecular Pharmacology**, [S.

I.], 2012.

BURNASHEV, Nail *et al.* Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. **The Journal of physiology**, [*S. I.*], v. 485, n. 2, p. 403–418, 1995.

CAMERA, Keli *et al.* Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, [*S. I.*], v. 192, n. 4, p. 457–464, 2007.

CARACI, Filippo *et al.* Neurotoxic properties of the anabolic androgenic steroids nandrolone and methandrostenolone in primary neuronal cultures. **Journal of Neuroscience Research**, [*S. I.*], v. 89, n. 4, p. 592–600, 2011.

CARTER, Chris. **Neuropharmacology of polyamines**. [*S. I.*]: Academic Press, 1994.

CENTRE, Drug Control; MONITORING, Drug; AGENCY, World Anti-doping. Pharmacology of anabolic steroids. [*S. I.*], n. March, p. 502–521, 2008.

CHENARD, B. L. *et al.* Separation of α 1Adrenergic and N-Methyl-D-aspartate Antagonist Activity in a Series of Ifenprodil Compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. I.*], 1991.

CHEUNG, Ada S.; GROSSMANN, Mathis. Physiological basis behind ergogenic effects of anabolic androgens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [*S. I.*], v. 464, n. November 2016, p. 14–20, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.047>

CHOI, Dennis W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, [*S. I.*], v. 1, n. 8, p. 623–634, 1988 a.

CHOI, Dennis W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends in neurosciences**, [*S. I.*], v. 11, n. 10, p. 465–469, 1988 b.

CHOI, Dennis W. Calcium and excitotoxic neuronal injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [*S. I.*], v. 747, n. 1, p. 162–171, 1994.

CLAESSENS, Frank *et al.* Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, [*S. I.*], v. 76, n. 1–5, p. 23–30, 2001.

CLARK, Ann S.; HENDERSON, Leslie P. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [*S. I.*], v. 27, n. 5, p. 413–436, 2003.

CLARK, Ann S.; LINDENFELD, Ralph C.; GIBBONS, Christopher H. Anabolic-androgenic steroids and brain reward. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 741–745, 1996.

CLARK, Ann S.; MITRE, Marcie C.; BRINCK-JOHNSEN, Truls. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. **Brain Research**, [S. l.], v. 679, n. 1, p. 64–71, 1995 a.

CLARK, Ann S.; MITRE, Marcie C.; BRINCK-JOHNSEN, Truls. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. [S. l.], v. 679, p. 64–71, 1995 b.

COFFEY, Vernon G.; HAWLEY, John A. **The molecular bases of training adaptation**. [S. l.: s. n.]

COHEN, Neal J.; SQUIRE, Larry R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. **Science**, [S. l.], 1980.

COHEN, Seymour Stanley. **Guide to the Polyamines**. [S. l.]: Oxford University Press, 1998.

COLOMBO, Paul J. *et al.* Kappa opioid receptor activity modulates memory for peck-avoidance training in the 2-day-old chick. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 108, n. 1–2, p. 235–240, 1992.

COMPAGNONE, Nathalie A.; MELLON, Synthia H. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. **Frontiers in neuroendocrinology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–56, 2000.

CULL-CANDY, Stuart G.; LESZKIEWICZ, Daniel N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Sci. STKE**, [S. l.], v. 2004, n. 255, p. re16–re16, 2004.

DE ROOY, Casey *et al.* Targeting muscle signaling pathways to minimize adverse effects of androgen deprivation. **Endocrine-related cancer**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. R15–R26, 2016.

DERKACH, V.; BARRIA, A.; SODERLING, T. R. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, [S. l.], v. 96, [s. d.].

DUARTE-GUTERMAN, Paula *et al.* Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. **Hormones**

and Behavior, [S. l.], 2015.

DUNCAN, Noel D.; WILLIAMS, David A.; LYNCH, Gordon S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, [S. l.], 1998.

DURAND, G. M. *et al.* Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 1992.

EHLERS, Michael D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. **Neuron**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 511–525, 2000.

EICHENBAUM, Howard *et al.* **The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space?**. [S. l.: s. n.]

EICHENBAUM, Howard; OTHERS. **Memory, amnesia, and the hippocampal system**. [S. l.]: MIT press, 1993.

EKLÖF, Ann-Charlotte *et al.* The anti-doping hot-line, a means to capture the abuse of doping agents in the Swedish society and a new service function in clinical pharmacology. **European journal of clinical pharmacology**, [S. l.], v. 59, n. 8–9, p. 571–577, 2003.

EL-SHAMARKA, Marwa El Sayed *et al.* Combined neurotoxic effects of cannabis and nandrolone decanoate in adolescent male rats. **NeuroToxicology**, [S. l.], 2020.

ELFVERSON, Martin *et al.* Chronic administration of the anabolic androgenic steroid nandrolone alters neurosteroid action at the sigma-1 receptor but not at the sigma-2 or NMDA receptors. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 61, n. 7, p. 1172–1181, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.005>

ENGLISH, K. M. *et al.* Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. **Hormone and Metabolic Research**, [S. l.], v. 33, n. 11, p. 645–652, 2001.

ENNACEUR, A. **One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues**. [S. l.: s. n.]

ESTRADA, Manuel *et al.* Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, [S. l.], v. 144, n. 8, p. 3586–3597, 2003.

FARRELL, Sara F.; MCGINNIS, Marilyn Y. Effects of pubertal anabolic-androgenic steroid (AAS) administration on reproductive and aggressive behaviors in male rats. **Behavioral neuroscience**, [S. l.], v. 117, n. 5, p. 904, 2003.

FARRELL, Sara F.; MCGINNIS, Marilyn Y. Long-term effects of pubertal anabolic-androgenic steroid exposure on reproductive and aggressive behaviors in male rats. **Hormones and behavior**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 193–203, 2004.

FERRANDO, Arny A. *et al.* Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 358–362, 2003.

FRÜHAUF, Pâmella Karina Santana *et al.* Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–11, 2015.

FREEDMAN, Leonard P. **Molecular biology of steroid and nuclear hormone receptors**. [S. l.]: Springer Science & Business Media, 1998.

FRÜHAUF, Pâmella Karina Santana *et al.* Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], 2015.

GAO, Wenqing; BOHL, Casey E.; DALTON, James T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical reviews**, [S. l.], v. 105, n. 9, p. 3352–3370, 2005.

GIELEN, Marc *et al.* Structural Rearrangements of NR1/NR2A NMDA Receptors during Allosteric Inhibition. **Neuron**, [S. l.], 2008.

GIORGI, Anthony; WEATHERBY, Robert P.; MURPHY, Peter W. Muscular strength, body composition and health responses to the use of testosterone enanthate: a double blind study. **Journal of science and medicine in sport**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 341–355, 1999.

GIROS, Bruno *et al.* Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, [S. l.], v. 379, n. 6566, p. 606, 1996.

GOMES, Guilherme Monteiro *et al.* Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. **Neurobiology of learning and memory**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. 589–595, 2010.

GOMES, Guilherme Monteiro *et al.* Inhibition of the polyamine system counteracts β -amyloid peptide-induced memory impairment in mice: Involvement of

extrasynaptic NMDA receptors. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

GORINI, Luana De Souza *et al.* Efeito de doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes androgênicos no cerebelo de camundongos. **Revista Neurociências**, [S. l.], 2015.

GROSSMAN, Elena J. *et al.* Growth hormone, IGF-I, and exercise effects on non-weight-bearing fast muscles of hypophysectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], 1997.

GUERRA, Gustavo Petri *et al.* Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 186, n. 2, p. 150–158, 2006.

GUERRA, Gustavo Petri; RUBIN, Maribel Antonello; MELLO, Carlos Fernando. Modulation of learning and memory by natural polyamines. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 112, p. 99–118, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.023>

GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clinica chimica acta**, [S. l.], v. 344, n. 1–2, p. 23–35, 2004.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, [S. l.], 1934.

HANDA, Avtar K.; FATIMA, Tahira; MATTOO, Autar K. Polyamines : Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. [S. l.], v. 6, n. February, p. 1–18, 2018.

HARDINGHAM, Giles E.; BADING, Hilmar. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 682, 2010.

HAYASHI, T.; SU, T. The Sigma Receptor : Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. [S. l.], p. 267–280, 2005.

HEBB, Donald O. **The organization of behavior**. [S. l.]: na, 1961.

HEINLEIN, Cynthia A.; CHANG, Chawnshang. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocrine reviews**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 175–200, 2002 a.

HEINLEIN, Cynthia A.; CHANG, Chawnshang. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. **Molecular endocrinology**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 2181–2187, 2002 b.

HERSHBERGER, L. G.; SHIPLEY, Elva G.; MEYER, Roland K. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 175–180, 1953.

HORAK, Martin *et al.* Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 24, n. 46, p. 10318–10325, 2004.

HORSTMAN, Astrid M. H. *et al.* Nandrolone decanoate administration does not attenuate muscle atrophy during a short period of disuse. **PLoS ONE**, [S. l.], 2019.

INOUE, Koichi *et al.* Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains. **Scientific reports**, [S. l.], v. 3, p. 2364, 2013.

ISAAC, John T. R.; NICOLL, Roger A.; MALENKA, Robert C. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. **Neuron**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 427–434, 1995.

IZQUIERDO, Ivan; MEDINA, Jorge H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, Mikel *et al.* Maximal strength and power, muscle mass, endurance and serum hormones in weightlifters and road cyclists. **Journal of Sports Sciences**, [S. l.], 2004.

JANG, Ming-Kuei *et al.* A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 101, n. 21, p. 8198–8203, 2004.

JOHANSSON, Pia *et al.* The effect on opioid peptides in the rat brain, after chronic treatment with the anabolic androgenic steroid, nandrolone decanoate. **Brain research bulletin**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 413–418, 2000.

JOKSIMOVIC, Jovana *et al.* Exercise attenuates anabolic steroids-induced anxiety via hippocampal NPY and MC4 receptor in rats. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], 2019.

KAILANTO, Sanna; KANKAANPÄÄ, Aino; SEPPÄLÄ, Timo. Subchronic steroid administration induces long lasting changes in neurochemical and behavioral response to cocaine in rats. **Steroids**, [S. l.], v. 76, n. 12, p. 1310–1316, 2011.

KALININE, Eduardo *et al.* Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice.

Hormones and Behavior, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 383–392, 2014.

KAMPA, MARILENA *et al.* The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1429–1431, 2002.

KANAYAMA, Gen *et al.* Cognitive deficits in long-term anabolic-androgenic steroid users. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], v. 130, n. 1–3, p. 208–214, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.11.008>

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, [S. l.], v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory: CAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. **Molecular Brain**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: Molecular Brain

KARAKAS, Erkan; SIMOROWSKI, Noriko; FURUKAWA, Hiro. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. **Nature**, [S. l.], v. 475, n. 7355, p. 249, 2011.

KARAMIAN, A. *et al.* An Intra-hippocampal injection of nandrolone induces learning and memory impairments in rat. **Drug Research**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 1–4, 2014.

KAUFMAN, Marc J. *et al.* Brain and cognition abnormalities in long-term anabolic-androgenic steroid users. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], 2015.

KAUR-SAWHNEY, Ravindar *et al.* Polyamines in plants: an overview. **J Cell Mol Biol**, [S. l.], v. 2, p. 1–12, 2003.

KEW, James N. C.; KEMP, John A. An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. **Journal of Physiology**, [S. l.], 1998.

KEW, James N. C.; TRUBE, Gerhard; KEMP, John A. A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. **Journal of Physiology**, [S. l.], 1996.

KICMAN, Andrew T.; GOWER, D. B. **Annals of**. [S. l.: s. n.].

KINDLUNDH, Anna M. S. *et al.* Dopaminergic effects after chronic treatment with nandrolone visualized in rat brain by positron emission tomography. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 26, n. 7–8, p.

1303–1308, 2002.

KINDLUNDH, Anna M. S. *et al.* Increased dopamine transporter density in the male rat brain following chronic nandrolone decanoate administration. **Neuroscience letters**, [S. l.], v. 356, n. 2, p. 131–134, 2004.

KLANGKALYA, B. Modulation of brain synaptic plasticity by steroid hormones. **Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet**, [S. l.], v. 88, p. S354-62, 2005.

KOURI, E. M. *et al.* Fat-free mass index in users and nonusers of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Journal of Sport Medicine**, [S. l.], 1995.

KOUSTENI, S. *et al.* Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 719–730, 2001.

KOUVELAS, Dimitrios *et al.* Nandrolone abuse decreases anxiety and impairs memory in rats via central androgenic receptors. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 925–934, 2008.

KOYUNCUOĞLU, Türkan *et al.* Oestrogen receptor ER α and ER β agonists ameliorate oxidative brain injury and improve memory dysfunction in rats with an epileptic seizure. **Experimental Physiology**, [S. l.], 2019.

KRÜSKEMPER, H. L. **Anabolic steroids**. [S. l.]: Elsevier, 2013.

KURLING-KAILANTO, Sanna *et al.* Blockade of androgen or estrogen receptors reduces nandrolone's ability to modulate acute reward-related neurochemical effects of amphetamine in rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], 2010.

KUSANO, T. *et al.* Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, [S. l.], v. 228, n. 3, p. 367–381, 2008.

LERMA, Juan. Spermine regulates N-methyl-d-aspartate receptor desensitization. **Neuron**, [S. l.], 1992.

LEROY, Didier *et al.* Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme a proposed role for the kinase stimulation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 33, p. 20820–20827, 1997.

LIAO, Dezhi; HESSLER, Neal A.; MALINOW, Roberto. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. **Nature**, [S. l.], v. 375, n. 6530, p. 400, 1995.

LIGHTFOOT, Helen L.; HALL, Jonathan. Endogenous polyamine function from the RNA perspective. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 42, n. 18, p. 11275–11290, 2014.

LISMAN, John; SCHULMAN, Howard; CLINE, Hollis. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 175, 2002.

LISTER, Richard G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, [S. l.], 1987.

LIU, Jun Liu *et al.* A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. **PLoS ONE**, [S. l.], 2009.

LLEDO, Pierre-Marie *et al.* Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. **Science**, [S. l.], v. 279, n. 5349, p. 399–403, 1998.

LOENNEKE, Jeremy P. *et al.* Is muscle growth a mechanism for increasing strength? **Medical Hypotheses**, [S. l.], 2019.

LONG, Scott F. *et al.* The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 839–856, 1996.

LOW, Chian Ming *et al.* Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2000.

LÜSCHER, Christian *et al.* Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. **Neuron**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 649–658, 1999.

LÜSCHER, Christian; MALENKA, Robert C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [S. l.], p. a005710, 2012.

LUTZ, Lindsey B. *et al.* Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. **Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 1106–1116, 2003.

LY, Lam P. *et al.* A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial of transdermal dihydrotestosterone gel on muscular strength, mobility, and quality of life in older men with partial androgen deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 86, n. 9, p. 4078–4088, 2001.

MAGNUSSON, Kristina *et al.* Enzymatic conversion of dynorphin A in the rat

brain is affected by administration of nandrolone decanoate. **Peptides**, [S. I.], v. 28, n. 4, p. 851–858, 2007.

MAGNUSSON, Kristina *et al.* Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats. **Neuroscience Letters**, [S. I.], v. 467, n. 3, p. 189–193, 2009 a.

MAGNUSSON, Kristina *et al.* Nandrolone decanoate administration dose-dependently affects the density of kappa opioid peptide receptors in the rat brain determined by autoradiography. **Neuropeptides**, [S. I.], v. 43, n. 2, p. 105–111, 2009 b.

MAGNUSSON, Kristina *et al.* Neuroscience Letters Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats. [S. I.], v. 467, p. 189–193, 2009 c.

MAHONEY, D. J. *et al.* Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **FASEB Journal**, [S. I.], 2005.

MAJEWSKA, Maria Dorota. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor mechanism of action and physiological significance. **Progress in neurobiology**, [S. I.], v. 38, n. 4, p. 379–394, 1992.

MÄKITIE, Laura T. *et al.* Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in alzheimer's disease. **Brain Pathology**, [S. I.], 2010.

MALENKA, Robert C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. **Cell**, [S. I.], v. 78, n. 4, p. 535–538, 1994.

MALENKA, Robert C.; NICOLL, Roger A. Long-term potentiation--a decade of progress? **Science**, [S. I.], v. 285, n. 5435, p. 1870–1874, 1999.

MASUKO, Takashi *et al.* A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D- aspartate receptor: Effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. **Molecular Pharmacology**, [S. I.], 1999.

MAURICE, Tangui *et al.* The interaction between neuroactive steroids and the σ_1 receptor function: Behavioral consequences and therapeutic opportunities. **Brain Research Reviews**, [S. I.], v. 37, n. 1–3, p. 116–132, 2001.

MCDANIEL, Katherine L.; MUNDY, William R.; TILSON, Hugh A. Microinjection of dynorphin into the hippocampus impairs spatial learning in rats.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 429–435, 1990.

MCEWAN, Iain Joseph. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain.

Endocrine-related cancer, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 281–293, 2004.

MCGAUGH, James L. Consolidating memories. **Annual review of psychology**, [S. l.], v. 66, p. 1–24, 2015.

MCGINNIS, Marilyn Y. *et al.* Physical provocation potentiates aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids. **Hormones and behavior**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 101–110, 2002.

MCGINNIS, MARILYN Y. Anabolic androgenic steroids and aggression: studies using animal models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1036, n. 1, p. 399–415, 2004.

MCGURK, J. F.; BENNETT, M. V.; ZUKIN, R. S. Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes.

Proceedings of the National Academy of Sciences, [S. l.], 2006.

MELLONI JR, Richard H. *et al.* Anabolic-androgenic steroid exposure during adolescence and aggressive behavior in golden hamsters. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 359–364, 1997.

MELLONI, Richard H.; FERRIS, Craig F. Adolescent anabolic steroid use and aggressive behavior in golden hamsters. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 794, n. 1, p. 372–375, 1996.

MIKOLAJCZAK, P. *et al.* Lack of ifenprodil anxiolytic activity after its multiple treatment in chronically ethanol-treated rats. **Alcohol and Alcoholism**, [S. l.], 2003.

MIKOLAJCZAK, Przemyslaw *et al.* Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], 2002.

MILLER-FLEMING, Leonor *et al.* Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. **Journal of molecular biology**, [S. l.], v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015.

MILNER, Brenda; SQUIRE, Larry R.; KANDEL, Eric R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 445–468, 1998.

MONNET, François P.; MAURICE, Tangui. The Sigma1 Protein as a Target for the Non-genomic Effects of Neuro(active)steroids: Molecular, Physiological, and Behavioral Aspects. **Journal of Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 100, n. 2, p.

93–118, 2006. Disponível em:

<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jphs/CR0050032?from=CrossRef>

MONTMINY, Marc. Transcriptional regulation by cyclic AMP. **Annual review of biochemistry**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 807–822, 1997.

MONY, Laetitia *et al.* Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 157, n. 8, p. 1301–1317, 2009 a.

MONY, Laetitia *et al.* Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors : molecular mechanisms and therapeutic potential Abbreviations : [S. l.], p. 1301–1317, 2009 b.

MONY, Laetitia *et al.* Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 30, n. 15, p. 3134–3146, 2011.

MORADPOUR, Farshad *et al.* Calcineurin is involved in retrieval of passive avoidance memory and synaptic plasticity impairment induced by Nandrolone administration in adolescent male rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], 2019.

MORGENTALER, Abraham. Testosterone deficiency and cardiovascular mortality. **Asian journal of andrology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 26–31, 2015.

MORRISON, Lesley D. *et al.* Polyamines in human brain: regional distribution and influence of aging. **Journal of neurochemistry**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 636–642, 1995.

MORRISON, Lesley D.; CAO, Xiao-Chun; KISH, Stephen J. Ornithine decarboxylase in human brain: influence of aging, regional distribution, and Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 288–294, 1998.

MORRISON, Lesley D.; KISH, Stephen J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, [S. l.], 1995.

MOTT, David D. *et al.* Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. **Nature neuroscience**, [S. l.], v. 1, n. 8, p. 659, 1998.

MOTTRAM, David R.; GEORGE, Alan J. Anabolic steroids. **Best practice & research clinical endocrinology & metabolism**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 55–69, 2000.

MUSHTAQ, Gohar *et al.* HHS Public Access. [S. l.], v. 22, n. 5, p. 527–534, 2016.

NORMAN, Anthony W.; MIZWICKI, Mathew T.; NORMAN, Derek P. G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature reviews Drug discovery**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 27, 2004.

ORLANDO, Rosamaria *et al.* Nanomolar concentrations of anabolic-androgenic steroids amplify excitotoxic neuronal death in mixed mouse cortical cultures. **Brain Research**, [S. l.], v. 1165, n. 1, p. 21–29, 2007.

PABBA, Mohan; SIBILLE, Etienne. Sigma-1 and N-methyl-D-aspartate receptors: a partnership with beneficial outcomes. **Molecular neuropsychiatry**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 47–51, 2015.

PAHK, Albert J.; WILLIAMS, Keith. Influence of extracellular pH on inhibition by ifenprodil at N-methyl-D-aspartate receptors in *Xenopus* oocytes. **Neuroscience letters**, [S. l.], v. 225, n. 1, p. 29–32, 1997.

PANDEY, Rukmani *et al.* Estrogen deficiency induces memory loss via altered hippocampal HB-EGF and autophagy. **The Journal of endocrinology**, [S. l.], 2020.

PAOLETTI, Pierre. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1351–1365, 2011.

PAOLETTI, Pierre; BELLONE, Camilla; ZHOU, Qiang. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 383, 2013.

PARK-CHUNG, Mijeong *et al.* Distinct Sites for Inverse Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Sulfated Steroids. **Molecular pharmacology**, [S. l.], v. 52, n. 6, p. 1113–1123, 1997.

PCHITSKAYA, Ekaterina; POPUGAEVA, Elena; BEZPROZVANNY, Ilya. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. **Cell calcium**, [S. l.], v. 70, p. 87–94, 2018.

PEGG, Anthony E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB life**, [S. l.], v. 61, n. 9, p. 880–894, 2009.

PEGG, Anthony E. Functions of polyamines in mammals. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 291, n. 29, p. 14904–14912, 2016.

PEGG, Anthony E.; MICHAEL, Anthony J. Spermine synthase. **Cellular and molecular life sciences**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 113–121, 2010.

PERRAIS, David; VERAN, Julien; MULLE, Christophe. Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. **Trends in pharmacological sciences**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 516–522, 2010.

PERRY, Paul J.; ANDERSEN, Kathleen H.; YATES, William R. Illicit anabolic steroid use in athletes: A case series analysis. **The American Journal of Sports Medicine**, [S. l.], 1990.

PHILLIP, Stuart M. **Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: Impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects)**. [S. l.: s. n.]

PRATT, William B.; TOFT, David O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocrine reviews**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 306–360, 1997.

REDDY, D. Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. **Frontiers in endocrinology**, [S. l.], v. 2, p. 38, 2011.

REDDY, Doodipala Samba. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *In: Progress in brain research*. [S. l.]: Elsevier, 2010. v. 186p. 113–137.

REDDY, Doodipala Samba; ESTES, William A. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. xx, p. 1–19, 2016 a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.04.003>

REDDY, Doodipala Samba; ESTES, William A. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. xx, p. 1–19, 2016 b.

ROCK, D. M.; MACDONALD, R. L. The polyamine spermine has multiple actions on N-methyl-D-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons. **Mol.Pharmacol.**, [S. l.], 1992.

ROGERSON, Shane *et al.* The effect of short-term use of testosterone enanthate on muscular strength and power in healthy young men. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 354–361, 2007.

ROSIC, Gvozden *et al.* Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: A brief report. **Neuroendocrinology Letters**, [S. l.], 2014.

ROSSBACH, U. L. W. *et al.* Nandrolone-induced hippocampal phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 357, n. 4, p. 1028–1033, 2007 a.

ROSSBACH, Uwe L. W. *et al.* Nandrolone-induced hippocampal

phosphorylation of NMDA receptor subunits and ERKs` s. [S. I.], v. 357, p. 1028–1033, 2007 b.

RUBIN, M. A. *et al.* Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural pharmacology**, [S. I.], v. 11, n. 1, p. 57–61, 2000.

RUBIN, Maribel A. *et al.* Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European journal of pharmacology**, [S. I.], v. 423, n. 1, p. 35–39, 2001.

RUBIN, Maribel A. *et al.* Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **Journal of Neuroscience**, [S. I.], v. 24, n. 9, p. 2328–2334, 2004.

RUTISHAUSER, Ueli. **Testing Models of Human Declarative Memory at the Single-Neuron Level**. [S. I.: s. n.]

RUZICKA, von L.; WETTSTEIN, A.; KAEGI, H. Sexualhormone VIII. Darstellung von Testosteron unter Anwendung gemischter Ester. **Helvetica Chimica Acta**, [S. I.], v. 18, n. 1, p. 1478–1482, 1935.

SABATINI, Bernardo L.; OERTNER, Thomas G.; SVOBODA, Karel. The life cycle of Ca²⁺ ions in dendritic spines. **Neuron**, [S. I.], v. 33, n. 3, p. 439–452, 2002.

SALE, Digby G. Neural adaptation to resistance training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [S. I.], 1988.

SALIMI, Zahra *et al.* Nandrolone improve synaptic plasticity at the hippocampus CA1 area and spatial localization in the Morris water maze of male adolescent rats. **Neuroscience Research**, [S. I.], 2019.

SALTER, Michael W.; KALIA, Lorraine V. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. I.], v. 5, n. 4, p. 317, 2004.

SALUNKE, Balwant P.; UMATHE, Sudhir N.; CHAVAN, Jagatpalsingh G. Involvement of NMDA receptor in low-frequency magnetic field-induced anxiety in mice. **Electromagnetic Biology and Medicine**, [S. I.], 2014.

SALVADOR, A. *et al.* Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice. **Perceptual and Motor Skills**, [S. I.], 1999.

SANDIN, J. *et al.* Hippocampal dynorphin B injections impair spatial learning in rats: a κ -opioid receptor-mediated effect¹. **Neuroscience**, [S. I.], v. 85, n. 2, p. 375–382, 1998.

SATTLER, Rita *et al.* Distinct influx pathways, not calcium load, determine

neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. **Journal of neurochemistry**, [S. l.], v. 71, n. 6, p. 2349–2364, 1998.

SATTLER, Rita; TYMIANSKI, Michael. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **Journal of molecular medicine**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 3–13, 2000.

SCHMIDT, Hayden R. *et al.* Crystal structure of the human σ 1 receptor. **Nature**, [S. l.], 2016.

SCHRÖR, K. *et al.* Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. **European journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 24, n. S1, p. 50–52, 1994.

SELAKOVIC, Dragica *et al.* The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. **PLoS ONE**, [S. l.], 2017.

SHANG, Yongfeng; MYERS, Molly; BROWN, Myles. Formation of the androgen receptor transcription complex. **Molecular cell**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 601–610, 2002.

SHIMADA, Atsuyoshi *et al.* Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 263, n. 3, p. 293–300, 1994.

SHIMIZU, Eiji *et al.* NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, [S. l.], v. 290, n. 5494, p. 1170–1174, 2000.

SIMONCINI, Tommaso; GENAZZANI, Andrea R. Non-genomic actions of sex steroid hormones. **European journal of endocrinology**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 281–292, 2003.

SINGH, Gurmeet K. S. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic study of subcutaneous injection of depot nandrolone decanoate using dried blood spots sampling coupled with ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry assays. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], 2014.

SINHA-HIKIM, Indrani *et al.* Testosterone-induced increase in muscle size in healthy, young men is associated with muscle fiber hypertrophy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], 2002.

SMITH, Sholeen T.; STACKMAN, Robert W.; CLARK, Ann S. Spatial working

memory is preserved in rats treated with anabolic-androgenic steroids. **Brain research**, [S. I.], v. 737, n. 1–2, p. 313–316, 1996.

SOTO, David *et al.* Molecular mechanisms contributing to TARP regulation of channel conductance and polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. **Journal of Neuroscience**, [S. I.], v. 34, n. 35, p. 11673–11683, 2014.

SQUIRE, Larry R.; STARK, Craig E. L.; CLARK, Robert E. THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. **Annual Review of Neuroscience**, [S. I.], 2004.

STARK, Felix *et al.* Protein kinase CK2 links polyamine metabolism to MAPK signalling in *Drosophila*. **Cellular signalling**, [S. I.], v. 23, n. 5, p. 876–882, 2011.

STORER, Thomas W. *et al.* Testosterone dose-dependently increases maximal voluntary strength and leg power, but does not affect fatigability or specific tension. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. I.], v. 88, n. 4, p. 1478–1485, 2003.

SULLIVAN, Jane M. *et al.* Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. **Neuron**, [S. I.], 1994.

SWEATT, J. David. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Current opinion in neurobiology**, [S. I.], v. 14, n. 3, p. 311–317, 2004.

TAJIMA, Nami *et al.* Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. **Nature**, [S. I.], v. 534, n. 7605, p. 63–68, 2016.

TODD, Terry. Anabolic steroids: the gremlins of sport. **Journal of sport history**, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 87–107, 1987.

TOMAZI, Lediane *et al.* A Nonrewarding NMDA Receptor Antagonist Impairs the Acquisition, Consolidation, and Expression of Morphine Conditioned Place Preference in Mice. **Molecular Neurobiology**, [S. I.], v. 54, n. 1, p. 710–721, 2017.

TONETTO, Lucas L. M. *et al.* Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. **Behavioral and Brain Functions**, [S. I.], v. 5, n. 1, p. 40, 2009.

TRAYNELIS, Stephen F. *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, [S. I.], v. 62, n. 3, p. 405–496, 2010.

TRAYNELIS, Stephen F.; CULL-CANDY, Stuart G. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. **Nature**, [S. I.], 1990.

TRAYNELIS, Stephen F.; HARTLEY, Melissa; HEINEMANN, Stephen F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. **Science**, [S. l.], v. 268, n. 5212, p. 873–876, 1995 a.

TRAYNELIS, Stephen F.; HARTLEY, Melissa; HEINEMANN, Stephen F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. **Science**, [S. l.], 1995 b.

TREIT, Dallas; MENARD, Janet; ROYAN, Cary. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [S. l.], 1993.

TRENT, Ron J. A. Molecular biology of steroid and nuclear hormone receptors. **Pathology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 74, 1999.

TRINCHESE, Fabrizio *et al.* Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 118, n. 8, p. 2796–2807, 2008.

TYMIANSKI, Michael *et al.* Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 2085–2104, 1993.

TYMIANSKI, Michael. Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. **Advances in neurology**, [S. l.], v. 71, p. 85–105, 1996.

TYMIANSKI, Michael; TATOR, Charles H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. **Neurosurgery**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 1176–1195, 1996.

UNNI, Emmanuel *et al.* Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. **Cancer research**, [S. l.], v. 64, n. 19, p. 7156–7168, 2004.

URDIALES, Jose L.; MEDINA, Miguel Á.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Francisca. Polyamine metabolism revisited. **European journal of gastroenterology & hepatology**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1015–1019, 2001.

VAN ZYL, Charl G.; NOAKES, Timothy D.; LAMBERT, Michael I. Anabolic-androgenic steroid increases running endurance in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [S. l.], 1995.

VELASCO, Ivan. Stem Cells with Neurogenic Potential and Steroid Hormones. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 13, p. 1684–1693, 2011.

VELÍŠEK, Libor *et al.* Lowering of extracellular pH suppresses low-Mg²⁺-induces seizures in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. **Experimental**

Brain Research, [S. l.], 1994.

VERROKEN, Michele. Ethical aspects and the prevalence of hormone abuse in sport. **Journal of endocrinology**, [S. l.], v. 170, n. 1, p. 49–54, 2001.

VOSLER, P. S.; BRENNAN, C. S.; CHEN, J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. **Molecular neurobiology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 78–100, 2008.

WALIA, Vaibhav; GARG, Chanchal; GARG, Munish. -Amantadine Exerts Anxiolytic Like Effect In Mice: Evidences for the Involvement of Nitrergic and GABAergic Signaling Pathways. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], p. 112432, 2019.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, [S. l.], 1976.

WEBB, Carolyn M. *et al.* Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. **Circulation**, [S. l.], v. 100, n. 16, p. 1690–1696, 1999.

WEDGWOOD, M. A.; WOLSTENCROFF, J. H. Effects of spermine and spermidine on single brain stem neurones. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 445–446, 1977.

WEILL-ENGERER, Sébastien *et al.* Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 87, n. 11, p. 5138–5143, 2002.

WESSON, Daniel W.; MCGINNIS, Marilyn Y. Stacking anabolic androgenic steroids (AAS) during puberty in rats: a neuroendocrine and behavioral assessment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 410–419, 2006.

WHITTEMORE, E. R. *et al.* Subtype-selective antagonism of NMDA receptors by nyliadin. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 337, n. 2–3, p. 197–208, 1997.

WILLIAMS, K. *et al.* Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. **Mol.Pharmacol.**, [S. l.], 1994.

WILLIAMS, Keith *et al.* Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. **Neuron**, [S. l.], 1990.

WILLIAMS, Keith *et al.* **Modulation of the NMDA receptor by polyamines.** [S. l.: s. n.]

WILLIAMS, Keith. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. **Molecular pharmacology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 851–859, 1993.

WILLIAMS, Keith. Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 161–168, 1994.

WILLIAMS, Keith. Pharmacological properties of recombinant N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors containing the ϵ {lunate}4 (NR2D) subunit. **Neuroscience Letters**, [S. l.], 1995.

WILLIAMS, Keith. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 325, n. 2, p. 289–297, 1997.

WU, Christopher; KOVAC, Jason R. **Novel Uses for the Anabolic Androgenic Steroids Nandrolone and Oxandrolone in the Management of Male Health**. [S. l.: s. n.]

YATIN, Servet M. *et al.* Alzheimer's amyloid β -peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: Protective effect of vitamin E. **Neuroscience Letters**, [S. l.], 1999.

YATIN, Servet M. *et al.* Role of spermine in amyloid β -peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. **Journal of neuroscience research**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 395–401, 2001.

YOUNG, A. R. *et al.* Direct vascular effects of agents used in the pharmacotherapy of cerebrovascular disease on isolated cerebral vessels. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [S. l.], 1981.

YU, Ji-Guo *et al.* Effects of long term supplementation of anabolic androgen steroids on human skeletal muscle. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e105330, 2014.

ZAGAR, Yvrick; CHAUMAZ, Gilles; LIEBERHERR, Michèle. Signaling cross-talk from G β 4 subunit to Elk-1 in the rapid action of androgens. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 4, p. 2403–2413, 2004.

ZAREI, Fatemeh *et al.* Nandrolone administration abolishes hippocampal fEPSP-PS potentiation and passive avoidance learning of adolescent male rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 130–139, 2018.

ZARRINDAST, Mohammad Reza *et al.* Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. **Pharmacology Biochemistry**

and Behavior, [S. l.], 2012.

ZHANG, L. *et al.* **Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition.** [S. l.: s. n.]

ZHANG, Quan Guang *et al.* Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], 2014.

ZHENG, F. *et al.* Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. **Nature neuroscience**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 894, 2001.

ZITZMANN, Michael; BRUNE, Maik; NIESCHLAG, Eberhard. Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 87, n. 11, p. 5030–5037, 2002.

ZOLA-MORGAN, S. *et al.* Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], 1992.