

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**MODULAÇÃO DA VIA DA AKT POR DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)  
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM DIFERENTES  
MODELOS EXPERIMENTAIS**

**Daiane da Rocha Janner**

**Porto Alegre - RS  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**MODULAÇÃO DA VIA DA AKT POR DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)  
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM DIFERENTES  
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -  
Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Daiane da Rocha Janner

Orientadora: Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

*“A verdadeira medida de um homem não é  
como ele se comporta em momentos de  
conforto e conveniência, mas como ele se  
mantém em tempos de controvérsias e desafio.”*

Martin Luther King

Dedico este trabalho, com todo o meu carinho, a todos que estiveram ao meu lado ao longo desta trajetória e que confiaram no meu trabalho, confortando-me com palavras de consolo e de motivação diante dos desafios encontrados.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente pela minha existência e pela oportunidade de seguir esta trajetória para a realização de um sonho, dando-me força e paciência diante dos desafios encontrados. A Ele, o meu sincero agradecimento

*“... Transformai-vos pela renovação de vossa mente, para que proveis qual é a boa, agradável e perfeita a vontade de Deus.”- Paulo. (ROMANOS, 12:2)*

À minha orientadora Maria Flávia Marques Ribeiro pela orientação, incentivo, confiança e paciência dedicada. Quero agradecer não apenas pelos ensinamentos, mas também pela amizade, transformando minha ansiedade em confiança, a dúvida, em certeza, a esperança em realização, guiando-me para além das teorias e das técnicas, ajudando-me a desvendar, em cada passo, os ensinamentos para toda a vida, como “ ter paciência”.

À querida e inseparável colega, Maria Helena Jacob, pelos ensinamentos técnicos para a realização dos experimentos e, principalmente, pela sua amizade e pelo seu exemplo de garra e de perseverar diante dos obstáculos encontrados.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski e ao colega Matheus P. Jahn pela cooperação e pela ajuda para realização dos experimentos. O meu sincero obrigada.

À Prof.Dr. Adriane Belló Klein pelo empréstimo de equipamentos

Às colegas de laboratório Susie e Adarly, meu agradecimento pelo grande apoio em vários momentos deste trabalho, pelo incentivo, amizade e cooperação.

Aos colegas Alex, Mariane e Renata pelas “longas” discussões sobre vias de sinalização, sugestões e pelos momentos de descontração e de divertidas conversas, tornando o trabalho no laboratório ainda mais empolgante.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo pelos ensinamentos e pelo incentivo durante os anos em que fui sua aluna de Iniciação Científica, permitindo o meu ingresso para a pesquisa científica

Ao meu companheiro, de todas as horas, Alexandre, que foi compreensivo diante das minhas preocupações, dando-me carinho, força e coragem para seguir em frente.

À minha família, pela compreensão nos momentos nos quais estive ausente e pelo apoio e confiança nas minhas escolhas.

Aos meus pais, o meu sincero obrigada. Pode ser que as minhas escolhas não tenham sido como sonharam. Pode ser que vocês não tenham sido o que pretendiam ser e eu não tenha lhes retribuído o que pretendiam ter. Porém, isso não importa, pois estou realizando um sonho e com a certeza de que nada disso existiria se um dia não tivessem confiado em mim, muitas vezes trabalhando dobrado, renunciando a seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pela força, compreensão e estímulo.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO .....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 ANIMAIS.....	29
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	29
4.3 FÁRMACOS.....	30
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.4.1 Validação do Modelo Experimental da Diabete.....	31
4.4.2 Sacrifício dos Animais.....	31
4.4.3 Homogeneização.....	31
4.4.4 Expressão da Akt pela técnica de Western Blot.....	32
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO AGUDO....	35
5.1.1 Hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA.....	35
5.1.2 Hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA.....	38
5.1.3 Hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA.....	41
5.1.4 Hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA.....	44
5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO CRÔNICO	47
5.2.1 Tratamento com DHEA em diferentes idades.....	47
5.2.1.1 Hipocampo.....	47
5.2.1.1.1 Experimento 1: comparação entre os grupos com 3 e com 13	47
meses de idade.....	
5.2.1.1.2 Experimento 2: comparação entre os grupos com 3 e com 18	50
meses de idade.....	
5.2.1.1.3 Experimento 3: comparação entre ratos com 3 e com 21 meses	53
de idade.....	
5.2.1.2 Hipotálamo.....	56
5.2.1.2.1 Experimento 1: comparação entre os grupos com 3 e com 13	56
meses de idade .....	
5.2.1.2.2 Experimento 2: comparação entre os grupos com 3 e com 18	59
meses de idade.....	
5.2.1.2.3 Experimento 3: comparação entre ratos com 3 e com 21 meses	62
de idade.....	
5.2.2 Tratamento com DHEA em ratos diabéticos.....	65

5.2.2.1 Glicemia.....	65
5.2.2.2 Hipocampo.....	67
5.2.2.3 Hipotálamo.....	70
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	99
8. REFERÊNCIAS.....	100

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Biossíntese dos esteróides	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	Substratos alvos da Akt	<b>10</b>
<b>Figura 3</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA	<b>36</b>
<b>Figura 4</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA	<b>37</b>
<b>Figura 5</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA	<b>39</b>
<b>Figura 6</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA	<b>40</b>
<b>Figura 7</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA	<b>42</b>
<b>Figura 8</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA	<b>43</b>
<b>Figura 9</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA	<b>46</b>
<b>Figura 11</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade	<b>48</b>
<b>Figura 12</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade	<b>49</b>
<b>Figura 13</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade	<b>51</b>
<b>Figura 14</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade	<b>52</b>
<b>Figura 15</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade	<b>54</b>
<b>Figura 16</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade	<b>55</b>
<b>Figura 17</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade	<b>57</b>
<b>Figura 18</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade	<b>58</b>

<b>Figura 19</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade	<b>60</b>
<b>Figura 20</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade	<b>61</b>
<b>Figura 21</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade	<b>63</b>
<b>Figura 22</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade	<b>64</b>
<b>Figura 23</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA	<b>68</b>
<b>Figura 24</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipocampo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA	<b>69</b>
<b>Figura 25</b>	Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA	<b>71</b>
<b>Figura 26</b>	Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Glicemia na primeira coleta de sangue	66
<b>Tabela 2</b>	Glicemia na segunda coleta de sangue	66

## RESUMO

A desidroepiandrosterona (DHEA) é um esteróide produzido pelas supra-renais humanas. Este esteróide também está presente em altas concentrações no encéfalo de diversas espécies e é sintetizado *de novo* no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo, portanto, classificado como um neuroesteróide. A DHEA está envolvida em diversas atividades funcionais no SNC, tais como o crescimento de neuritos, comportamento, neuroproteção contra danos induzidos por aminoácidos excitatórios, estresse oxidativo, isquemia-reperfusão e hiperglicemia. Por apresentar efeitos cardioprotetores, antidiabéticos e antienvhecimento, foi sugerido que este poderia ser um hormônio “da juventude”. Tais efeitos poderiam estar relacionados com suas ações indiretas nas células neuronais e gliais pela sua conversão em esteróides androgênicos e estrogênicos. Por outro lado, sabe-se que a DHEA pode interagir com receptores de membrana, tais como GABA<sub>A</sub>, NMDA, sigma e receptores acoplados à proteína G. Todavia, seus mecanismos moleculares de ação não são completamente conhecidos. Além disso, o efeito neuroprotetor da DHEA pode ocorrer pela modulação de vias intracelulares relacionadas com a promoção do crescimento e da sobrevivência celular, como, por exemplo, a via da proteína cinase B (Akt). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da administração de DHEA sobre a modulação da proteína Akt no hipotálamo e no hipocampo de ratos em diferentes modelos experimentais, os quais envolvem maior ou menor dano ao SNC. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos com 3, 13, 18 e 21 meses de idade (n=3-5/grupo). O tratamento agudo foi realizado em ratos com 3 meses de idade, com uma injeção intraperitoneal de DHEA nas doses 1, 5, 10 ou 50mg/kg e os ratos foram decapitados 6 ou 24 horas após o tratamento. Para investigar o efeito do tratamento crônico com DHEA, ratos com diferentes idades (3, 13, 18 e 21 meses) e diabéticos (3 meses) receberam uma injeção subcutânea de DHEA (10mg/kg) por semana durante 5 semanas. A diabetes foi induzida por estreptozotocina (70 mg/kg). Após o término de cada experimento, os ratos foram decapitados, os encéfalos foram removidos e o hipocampo e o hipotálamo foram dissecados. Após homogeneização, centrifugação e quantificação de proteínas, as amostras foram preparadas para a técnica de Western blot para análise da expressão da proteína Akt total e fosforilada. A imunorreatividade foi revelada por quimiluminescência (ECL) e a quantificação realizada em analisador de imagem (Image Master VDS).

Realizando-se uma curva de dose (tratamento agudo), a DHEA aumentou a fosforilação da Akt tanto no hipocampo como no hipotálamo. No hipocampo, o tratamento com DHEA na maior dose testada (50mg/kg) aumentou a fosforilação da Akt após 6 horas, mantendo-se após 24 horas. Além disso, a Akt total também aumentou após 24 horas na mesma dose. No hipotálamo, houve um aumento da fosforilação da Akt apenas após 24 horas de tratamento e também na dose de 50mg/kg. O tratamento crônico com DHEA em animais adultos (3 meses) não modificou a relação Akt fosforilada/Akt total, bem como a expressão da Akt total e da sua fosforilação em ambas as estruturas analisadas.

Com relação ao efeito do envelhecimento sobre a via da Akt, os resultados foram distintos entre as idades, assim como entre as estruturas. No hipocampo de animais com 13, 18 e 21 meses, houve uma redução da fosforilação da Akt comparando-se com seus respectivos grupos controle (3 meses). Porém, a Akt total aumentou apenas aos 13 meses e diminuiu aos 21 meses em relação aos seus grupos controle. No hipotálamo, embora não tenha sido encontrada diferença significativa na Akt total e na sua fosforilação, houve uma redução na relação Akt fosforilada/Akt total comparando-se o grupo 13 meses e 21 meses com seus grupos controle. Tanto no hipotálamo, como no hipocampo, o tratamento com DHEA em animais com 13 meses de idade reduziu a fosforilação da Akt assim como a sua relação com Akt total, em comparação com o grupo da mesma idade não tratado. Apenas no hipocampo, o tratamento com DHEA aumentou a Akt total aos 13, 18 e 21 meses. Em animais diabéticos, houve uma redução da relação Akt fosforilada/Akt total, assim como da fosforilação da Akt comparando-se com animais não-diabéticos em ambas as estruturas analisadas. Porém, o tratamento com DHEA reverteu estas reduções apenas no hipotálamo.

Os resultados deste estudo contribuem para o esclarecimento das vias intracelulares reguladas pela DHEA, sugerindo que a DHEA realmente modula a via da Akt em diferentes protocolos de tratamento. O conhecimento sobre estes mecanismos podem acrescentar dados importantes para sua utilização terapêutica e para o desenvolvimento de protocolos adequados de tratamento com DHEA no envelhecimento e na diabetes, nos quais os processos de neurodegeneração estão presentes em diferentes graus.

## 1. INTRODUÇÃO

Os hormônios esteróides são sintetizados principalmente no córtex das glândulas supra-renais, nas gônadas (testículo e ovário) e na placenta. A síntese de hormônios esteróides requer diversas reações enzimáticas seqüenciais que convertem o colesterol em glicocorticóides, mineralocorticóides ou hormônios sexuais e inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona. Esta reação é catalisada pela enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (*side chain cleavage*) presente na membrana mitocondrial interna, a qual remove a cadeia lateral de 6 carbonos da molécula de colesterol. O passo limitante é a entrega de colesterol para a membrana mitocondrial interna. O transporte de colesterol através da membrana mitocondrial é mediado pela proteína de regulação estereoidogênica aguda (StAR- *Steroidogenic acute regulatory protein*).

A determinação de qual esteróide será sintetizado pelo tecido depende da expressão de enzimas e /ou da competição entre as enzimas por um substrato particular. A P450<sub>c11β</sub> e P450<sub>c11AS</sub> estão expressas nas supra-renais e não nas gônadas e na placenta, resultando na produção de glicocorticóides e mineralocorticóides, enquanto P450<sub>c17</sub> nos testículos resulta na produção de androgênios e a expressão da P450 aromatase nos ovários resulta na produção de estrogênios.

A síntese de hormônios esteróides ocorre de acordo com o esquema apresentado na Figura 1.

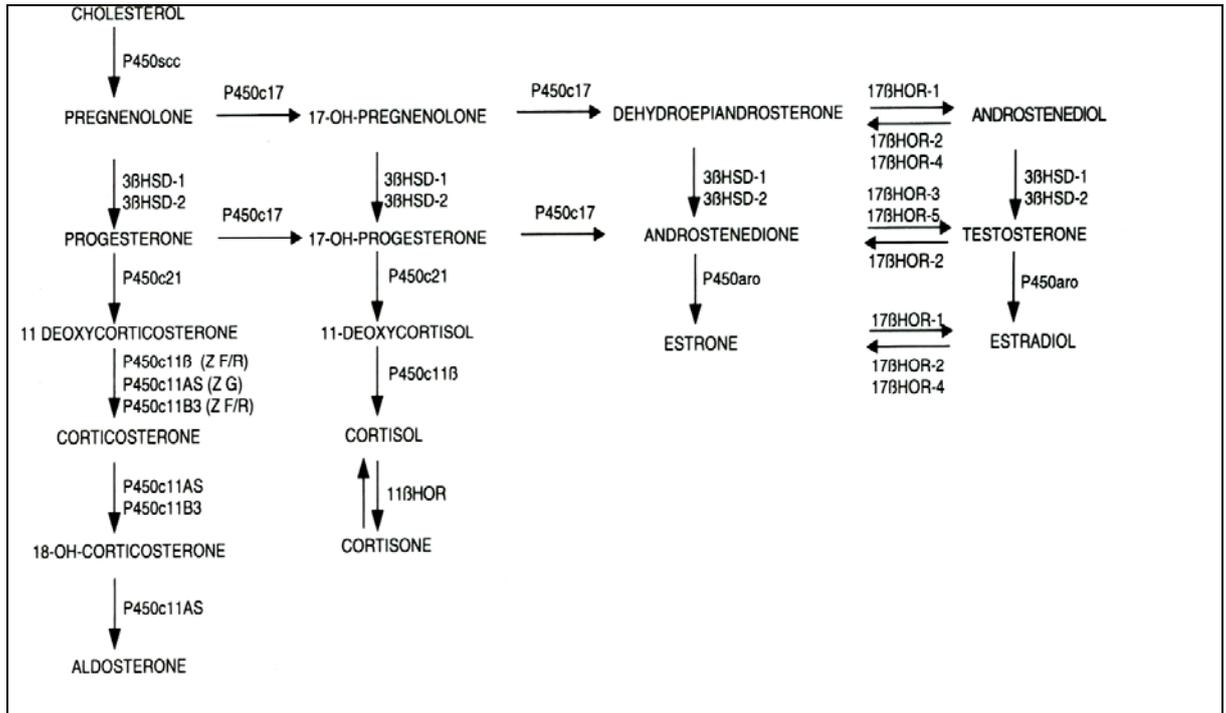


Figura 1: Biossíntese dos esteróides (BAULIEU *et al*, 1999)

Por serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica facilmente, devido a sua característica lipofílica, os esteróides sexuais podem agir no sistema nervoso central, sendo este um importante órgão-alvo para suas diversas ações. Esses hormônios exercem funções neuroendócrinas e participam de diversas funções regulatórias no sistema nervoso central, estando envolvidos com o crescimento, maturação e diferenciação do sistema nervoso central. Apresentam ações neuroprotetoras importantes, modulando o estado redox, os processos de neuroregeneração e comportamentos, tais como a depressão e a ansiedade. Sendo assim, as funções dos hormônios esteróides sexuais vão muito além de suas funções reprodutivas, pois regulam as funções neuronais e gliais por diversos mecanismos de ação (SHUMACHER *et al*, 2003).

Já está bem definido que o encéfalo é um órgão esteroidogênico, assim como as gônadas, as supra-renais e a placenta. A desidroepiandrosterona (DHEA) e seu conjugado sulfatado, desidroepiandrosterona sulfatada (DHEAS), foram os primeiros esteróides identificados no encéfalo de rato (CORPÉCHOT *et al*, 1981). Logo após

esse achado, a pregnenolona (PREG) e seu conjugado sulfatado (PREGS) também foram encontrados nesta estrutura (CORPÉCHOT *et al*, 1983). Também, a concentração destes esteróides encontrados no encéfalo é maior do que na circulação. Além disso, as concentrações de PREG e de PREGS, DHEA e DHEAS, além da progesterona e de seus metabólitos, como a alopregnenolona, permaneciam constantes no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), mesmo após a remoção das gônadas e das glândulas supra-renais. Por outro lado, os níveis de corticosterona e testosterona declinaram após a remoção das glândulas endócrinas. Portanto, estes esteróides poderiam ser sintetizados *de novo* (a partir do colesterol) nestas regiões, no mínimo parcialmente independente da secreção periférica. (CORPECHÓT *et al*, 1981, 1983; BAULIEU, 1996, 1997, 1998; BAULIEU *et al*, 1999; COMPAGNONE & MELLON, 2000).

Assim, “neuroesteróides” foi o nome proposto para esses esteróides referindo-se à sua origem incomum e para diferenciá-los dos esteróides oriundos dos órgãos estereoidogênicos clássicos e o termo “neuroestereoidogênese” também foi estabelecido (MELLON, 2007). Os principais neuroesteróides são a progesterona, a 5 $\alpha$ -pregnane-ol-ona (alopregnenolona), a pregnenolona e a desidroepiandrosterona e seus ésteres sulfatados (PREGS e DHEAS) (BAULIEU *et al*, 1997, 1998, 1999; PLASSART-SCHIESS & BAULIEU, 2001; MELLON, 2007). Estes esteróides, que eram classicamente conhecidos como precursores ou metabólitos, sem um papel ativo próprio, apresentaram efeitos importantes no SNC e SNP, e desde o tempo de sua descoberta, os mecanismos e receptores através dos quais eles exercem suas funções têm sido bastante estudados, assim como a relação destes esteróides com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas com a idade (MELLON, 2007).

O termo neuroesteróide é muitas vezes aplicado a esteróides que são formados a partir dos hormônios circulantes dentro do sistema nervoso, tais como o estradiol e a testosterona. O problema é que estes, ao contrário daqueles sintetizados *de novo*, a partir do colesterol local, desaparecem deste tecido após a remoção cirúrgica das glândulas estereoidogênicas. Então, o critério para a definição de neuroesteróide é que, mesmo após a gonadectomia ou adrenalectomia, o hormônio deve persistir no sistema nervoso (SCHUMACHER *et al*, 2003). Dessa

forma, esteróides que são formados exclusivamente a partir de precursores oriundos da circulação, como os estrogênios, que derivam da aromatização da androstenediona e testosterona circulantes, não são qualificados como neuroesteróides (COMPAGNONE & MELLON, 2000). Nestes casos, o termo aplicado é “esteróide neuroativo”. O termo “esteróide neuroativo” inicialmente foi proposto a todos os esteróides sintéticos ou naturais que rapidamente alteram a excitabilidade dos neurônios ligando-se a receptores de membrana (PAUL & PURDY, 1992). Este termo é usado freqüentemente para designar esteróides capazes de modificar as atividades biológicas no sistema nervoso, independente da sua origem (STOFFEL-WAGNER, 2001; SCHUMACHER *et al*, 2003; DUBROVSKY, 2005).

Para verificar se os esteróides realmente eram sintetizados no encéfalo ou se eles se acumulariam em regiões específicas dos tecidos nervosos, diversos estudos foram realizados para determinar se as enzimas envolvidas na esteroidogênese das glândulas clássicas eram responsáveis pela síntese dos neuroesteróides. E os resultados encontrados foram que, de fato, estas enzimas estavam presentes no sistema nervoso de diversas espécies durante o desenvolvimento e na vida adulta (ZWAIN & YEN, 1999 a,b; COMPAGNONE & MELLON, 2000; SCUMACHER *et al*, 2003, VALLÉ *et al*, 2004, KOHCHI *et al*, 1998). A citocromo P450 scc, que é característica de todas as células estereoidogênicas, foi encontrada no sistema nervoso de diferentes classes de vertebrados como anfíbios, pássaros, mamíferos, incluindo o homem, mostrando sua importante função ao longo da evolução (LE GOASCOGNE *et al*, 1987; TAKASE *et al*, 1999; TSUTSUI & YAMAZAKI, 1995, COMPAGNONE & MELLON, 2000; STOFFEL-WAGNER 2001, 2003).

No encéfalo de humanos, após a morte, a presença das enzimas P450scc, aromatase, 5 $\alpha$ -redutase, 3 $\alpha$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\alpha$ -HSD) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) fornece evidências de que os neurosteróides podem ser produzidos neste local. Contudo, o significado e a importância fisiopatológica desta descoberta permanecem por ser elucidados (STOFFEL-WAGNER 2001, MELLON 2007).

Os neuroesteróides são sintetizados no tecido nervoso em muitas categorias celulares, incluindo oligodendrócitos, células de Schwann, astrócitos tipo 1 e

neurônios (PLASSART-SCHIESS & BAULIEU, 2001; ZWAIN & YEN, 1999b; SCHUMACHER *et al*, 2000, 2001). A expressão das enzimas esteroideogênicas é regulada conforme o grau de desenvolvimento, com algumas enzimas sendo mais expressas apenas durante o desenvolvimento embrionário, enquanto outras são expressas durante este período e na vida adulta (COMPAGNONE & MELLON, 2000).

A maior parte das enzimas foi encontrada no córtex cerebral, no hipocampo, no hipotálamo, no bulbo olfatório, nos núcleos da base, cerebelo e no tronco encefálico de ratos adultos (VALLÉE *et al*, 2004). A expressão de algumas enzimas também foi identificada em várias regiões do sistema nervoso periférico de ratos (MELLON *et al*, 2001). No rato adulto, foi encontrado o RNAm da P450scc mais abundantemente no córtex e em menor extensão na amígdala e no hipocampo, tanto de ratos machos como de fêmeas (COMPAGNONE & MELLON, 2000).

Embora muitas enzimas envolvidas na neuroesteroidogênese tenham sido descritas no SNC e SNP, falta um entendimento detalhado de quais esteróides são sintetizados em determinadas regiões, assim como em que estágio do desenvolvimento. De fato, este entendimento é bastante difícil, pois a síntese de neuroesteróides envolve a cooperação de diversos tipos celulares dentro do sistema nervoso (SN) e também porque as diferentes enzimas envolvidas podem estar localizadas no mesmo tipo celular (COMPAGNONE & MELLON, 2000; MELLON *et al*, 2001; DUBROVSKY 2005).

Os esteróides produzidos pelas gônadas e supra-renais são secretados na corrente sanguínea e alcançam suas células-alvo distantes, em baixas concentrações. Esta corresponde à forma endócrina do modo de ação dos hormônios. Por outro lado, os esteróides que são produzidos no SN pelos neurônios e células gliais atuam localmente via ações autócrinas e parácrinas, possivelmente em concentrações maiores do que aquelas consideradas fisiológicas para hormônios esteróides circulantes, presentes geralmente numa faixa nanomolar. Portanto, os estudos farmacológicos que mostram os efeitos dos esteróides em concentrações micromolares sobre os sistemas de neurotransmissores, podem ter significância biológica. Porém, ainda é difícil comprovar, pois, a mensuração de concentrações

em microambientes como nas fendas sinápticas não é fácil (SCHUMACHER *et al*, 2000; PLASSART-SCHIES & BAULIEU, 2001).

Os esteróides neuroativos podem regular a expressão gênica pela ligação a receptores nucleares, ou a neurotransmissão, por sua ação em canais iônicos de membrana e em outros receptores de neurotransmissores (MELLON *et al* 2001, PLASSART-SCHIES & BAULIEU, 2001). No modelo clássico de ação dos hormônios esteróides, eles ligam-se a receptores citosólicos cognatos. Posteriormente, estes receptores mudam sua conformação pela dissociação de moléculas *chaperonas* (proteínas de choque térmico-HSP) e o complexo esteróide/receptor transloca-se para o núcleo onde se liga como homodímeros ou heterodímeros aos respectivos elementos responsivos, localizados em regiões regulatórias dos genes promotores alvos no DNA. Após, ocorre a síntese de RNA e a síntese de proteínas no citosol, que podem ser enzimas, receptores ou hormônios que executarão a adaptação ao estímulo. Esta ação é tradicionalmente chamada de ação genômica. Respostas para este tipo de sinalização hormonal podem levar muitas horas.

Porém, desde os anos 60, há evidências de efeitos não-genômicos mediados por esteróides. A aldosterona rapidamente modifica (~3 minutos) a saída de sódio em eritrócitos. Não apenas o tempo é curto para a transcrição, mas também estas células não apresentam núcleo, portanto o efeito não poderia ser genômico (DUBROVSKY, 2005). Ações rápidas de membrana dos esteróides têm sido freqüentemente qualificadas como “não-genômicas”. Esses efeitos não-genômicos não dependem da transcrição gênica ou da síntese protéica e implicam na modulação por esteróides de proteínas regulatórias citoplasmáticas ou ligadas à membrana plasmática.

Os esteróides ligam-se e modulam diferentes tipos de receptores de membrana tais como os ionotrópicos, tais como o receptor do ácido gama aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>), receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico (AMPA) e cainato. O papel modulatório dos esteróides neuroativos incluem também sua influência em receptores nicotínicos, muscarínicos e serotoninérgicos (PLASSART-SCHIESS & BAULIEU, 2001; STOFFEL-WAGNER, 2003; RUPRECHT, 2003; DUBROVSKY, 2005; MELLON, 2007). A ação dos neuroesteróides nestes receptores resulta em

efeitos comportamentais associados a estes. A modulação de receptores para GABA<sub>A</sub> e NMDA está envolvida nos efeitos psicofarmacológicos dos esteróides e permite explicar os efeitos anticonvulsivos, ansiolíticos, antidepressivos e sedativos, assim como sua influência na memória (SCHUMACHER *et al*, 2000). A estimulação do GABA<sub>A</sub> por esteróides neuroativos leva a uma diminuição da ansiedade e tem efeito anestésico e antiepilético (MELLON *et al*, 2001, DUBROVSKY, 2005).

Como regra prática, os efeitos não-transcricionais podem ser sugeridos por:

(i) ações muito rápidas para serem compatíveis com a síntese de proteínas (isto é, ocorre dentro de segundos a minutos, a partir da indução hormonal);

(ii) ações que podem ser reproduzidas na presença de inibidores de RNA ou da síntese protéica;

(iii) ações que podem ser reproduzidas pelo uso de hormônios esteróides ligados a moléculas insolúveis na membrana celular;

(iv) ações que são desencadeadas por hormônios esteróides via ligação com receptores contendo mutações que os tornam incapazes de ativar processos transcricionais (SIMONCINI & GENAZZANI, 2003).

Porém, prefere-se evitar o termo “não-genômico” porque as ações nas membranas celulares podem produzir mudanças a longo prazo nas células, podendo modificar a expressão gênica de algumas proteínas por ativarem vias de sinalização intracelular. Diversas ações biológicas relevantes dos esteróides associam-se com este tipo de sinalização. As cascatas reguladoras, tais como as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), cinases lipídicas (cinase do fosfatilinositol 3 - PI3-cinase) e tirosina-cinases são moduladas por esteróides via mecanismos não-transcricionais. Estas vias são transdutoras de sinais iniciados por diferentes fatores de crescimento e a ativação está relacionada com eventos celulares importantes, incluindo proliferação e sobrevivência celular. Além disso, foi demonstrada a modulação por receptores para hormônios esteróides de moléculas associadas à membrana celular, tais como canais iônicos acoplados à proteína G (SIMONCINI & GENAZZANI, 2003; SIMONCINI *et al*, 2003; BRYANT *et al*, 2006).

A PI3-cinase (PI3-K) é uma enzima amplamente expressa que regula diversos processos celulares, tais como proliferação, crescimento e apoptose. Essa enzima fosforila principalmente os fosfolipídios de inositol. Diversos receptores de

membrana, especialmente os receptores tirosina-cinases e outros tipos de receptores de membrana, entre eles alguns associados à proteína G, podem ativar a PI3-K. Esta enzima é formada por duas subunidades: p-85 (regulatória) e p-110 (catalítica), que estão dissociadas e juntam-se no momento da ativação. A atividade enzimática primária é a fosforilação de fosfatidilinositol (PI-fosfolipídios de membrana) na posição D3 do grupo inositol, catalisando a síntese de mediadores lipídicos que atuam como segundos mensageiros, transferindo a cascata de sinalização para proteínas cinases intracelulares. Os lipídios gerados são fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PI (3,4)P<sub>2</sub>) e o fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP(3,4,5)P<sub>3</sub>), e estes ligam-se a moléculas que possuem domínios homólogos à pleckstrina (PH-*Pleckstrin homology*), recrutando-as para a membrana (KANDEL & HAY, 1999; KRASILNIKOV, 2000; KIM & CHUNG, 2002).

Um dos alvos principais desta cascata de sinalização, e dos segundos mensageiros gerados pela ativação da PI3-K, é a proteína cinase B (PKB) ou Akt. A Akt é uma serina-treonina cinase que pertence à superfamília de proteínas cinases AGC (proteína cinase A dependente de AMPc/Proteína cinase G/Proteína cinase C) que compartilham semelhança estrutural dentro do domínio catalítico. Em mamíferos, foram encontradas três isoformas da Akt: PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 e PKB $\gamma$ /Akt3. A Akt1 é expressa na maioria dos tecidos. Akt2 é predominantemente expressa em tecidos-alvo da insulina, tais como adipócitos, fígado e músculo esquelético. Akt3 é menos amplamente expressa, sendo que sua expressão é alta no encéfalo (SALE & SALE, 2007). A Akt é uma proteína citosólica de 57kDa envolvida com a regulação do metabolismo, do crescimento, da proliferação e da sobrevivência celular. A ativação da Akt1 é um processo que envolve várias etapas e proteínas. A ativação da PI3-K por fatores de crescimento e por insulina resulta no aumento dos segundos mensageiros lipídicos, os quais interagem com o domínio PH da Akt1 recrutando esta cinase para a membrana plasmática e expondo seus resíduos serina e treonina para a fosforilação por cinases associadas à membrana, como a proteína-cinase dependente de fosfatidilinositol 1 e 2 (PDK-1 e 2-*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1 e -2*). A PDK1 fosforila a Akt1 no resíduo de treonina 308 da alça de ativação e a PDK2 fosforila a Akt1 no resíduo de serina 473 (KANDEL & HAY, 1999; KIM & CHUNG, 2002; SONG *et al*, 2005; SALE & SALE,

2007). Concentrações relativamente baixas de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), induzem a proliferação celular por ativar a via PI3-K/Akt, pela ativação de receptores para fatores de crescimento. Baixas concentrações de ERO são importantes para regular a proliferação e a diferenciação celular, ao passo que altas concentrações são deletérias e podem induzir a apoptose (YOON *et al*, 2002). A cascata de sinalização é controlada negativamente por diversas fosfatases, incluindo a proteína fosfatase tirosina 1B (PTB1B-*protein tyrosine phosphatase 1B*), fosfatase e tensina homóloga ao cromossoma 10 (PTEN-*phosphatase and tensin homolog on chromosome 10*) e fosfatidilinositóis contendo o domínio SH2 (SHIP2), todos inativados dentro de moderadas condições oxidativas. Na presença de ATP e peróxido de hidrogênio, a cinase do receptor de insulina é fosforilada, gerando ação catalítica na ausência do substrato (insulina). O balanço entre a atividade das fosfatases e cinases determina a taxa de fosforilação do receptor de insulina e dos diversos substratos-alvo, entre eles a Akt (DRÖGE & SCHIPPER, 2007; SCHIMITT *et al*, 2005).

Uma vez ativada, a Akt dissocia-se da membrana plasmática e fosforila diversos substratos no citoplasma e no núcleo. A diversidade de substratos identificados continua crescendo e ainda há muito para compreender sobre seu papel fisiológico, especialmente no encéfalo (SALE & SALE, 2007). Na Figura 2, alguns substratos da Akt são apresentados.

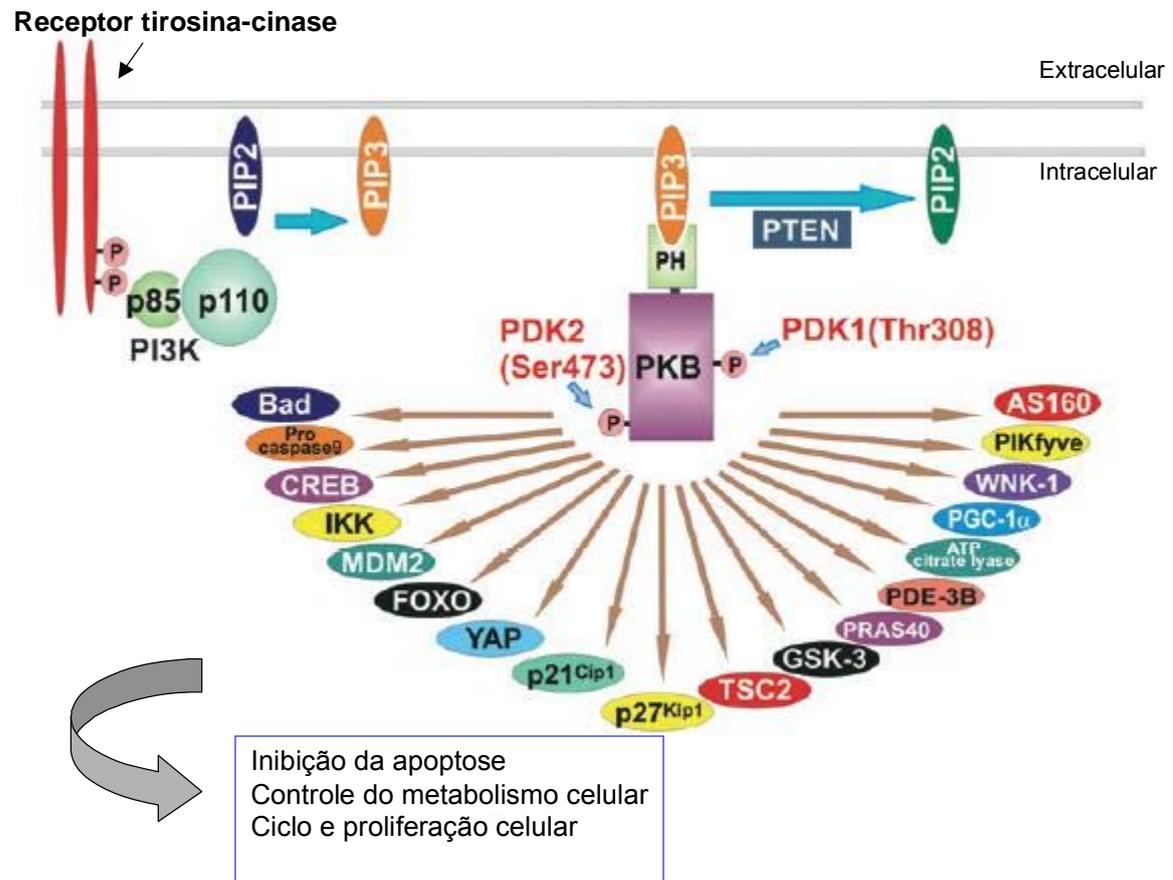


Figura 2: Substratos alvos da Akt (Figura modificada de Sale & Sale, 2007)

A Akt pode regular o metabolismo da glicose em diversos níveis, pois aumenta a captação de glicose em tecidos responsivos à insulina aumentando a expressão dos transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT3 (BARTHEL *et al*, 1999), e induz a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (KHON *et al*, 1996). A Akt também ativa a síntese de glicogênio através da inativação da GSK3 $\beta$  (glicogênio sintase cinase 3), o primeiro substrato identificado para Akt. Esta última enzima também exerce diversas ações em sistemas de sinalização intracelular participando da regulação da síntese de proteínas, da proliferação e diferenciação celular, dinâmica de microtúbulos, motilidade celular e da apoptose (CHIN *et al*,

2005; GRIMES & JOPE, 2001; JOPE & JOHNSON, 2004). A ativação da Akt resulta na inativação da GSK3 $\beta$  pela fosforilação dos resíduos de serina N-terminal. Outros substratos como os fatores de transcrição BAD, caspase-9 e *Forkhead*, componentes da maquinaria apoptótica, são inibidos pela Akt, evitando a apoptose (KIM & CHUNG, 2002). O fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) é um regulador chave da resposta imunológica e sua desregulação está relacionada com o desenvolvimetro de diversas doenças autoimunes e câncer, e é um outro fator alvo da Akt implicado na sobrevivência celular (KANE *et al*, 1999). A Akt está envolvida na sobrevivência de diversos tipos celulares, incluindo neurônios (KULIK & WEBER, 1998), onde a ativação da Akt por fatores de crescimento aumenta a sobrevivência neuronal inibindo a apoptose (DATTA *et al*, 2002; BRAZIL *et al*, 2002).

Devido a seus diversos substratos e suas respectivas funções, a Akt pode ser o principal eixo na sinalização celular, um componente central que conecta diversos sinais de entrada para a promoção da diversidade de suas respostas, desempenhando um papel fisiológico importante. Devido à sua versátil função (envolvimento na regulação de diversos fenômenos biológicos), o erro nesta via de sinalização pode estar na origem de diversas doenças. De fato, a elevada fosforilação da via da Akt está implicada na angiogênese e na progressão de tumores. A desregulação ou a elevada expressão da Akt foi encontrada em diversos tipos de câncer, com uma incidência maior de 50% em alguns casos. Por outro lado, sua inativação pode estar relacionada com a diminuição da captação de glicose e resistência à insulina (SALE & SALE, 2007; KIM & CHUNG, 2002; SONG *et al*, 2005; KANDEL & HAY, 1999;). Além disso, recentes estudos usando modelos *in vivo*, relatam sua função nos processos de envelhecimento e diabetes. Por outro lado, a atividade da Akt está reduzida em pacientes com diabetes do tipo II (SALE & SALE, 2007). A diminuição da atividade PI3K/Akt relaciona-se com alterações das concentrações das moléculas sinalizadoras para estas vias, tais como insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), bem como alterações dos substratos do receptor de insulina (IRS) e do receptor IGF-I (IGF-IR), fatores que estão modificados com o envelhecimento e na diabetes.

No envelhecimento, há uma perda progressiva das funções, diminuindo a habilidade do organismo de responder a fatores estressores, aumentando o

desequilíbrio homeostático e a incidência de doenças tendo a morte como última consequência (WEINERT & TIMIRAS, 2003). Este declínio funcional ocorre dentro das células individuais e dentro de organismos como um todo. A expectativa de vida depende tanto do envelhecimento biológico como das circunstâncias da vida do organismo. Há dois séculos, a média de vida estava em torno de 24 anos devido à elevada mortalidade infantil, à higiene precária e à inexistência de tratamentos eficazes para doenças infecciosas (FUTTERMAN & LEMBERG, 2000). Porém, com o desenvolvimento de princípios de higiene, do grande avanço da medicina e da abundante produção alimentar, a expectativa média em muitos países desenvolvidos atingiu 80 anos ou até mais (JACKSON *et al*, 2003). O contingente de idosos daqui a 30 anos vai representar 40% da população da Alemanha, do Japão e da Itália. Estima-se que, em 2050, a expectativa de vida nos países desenvolvidos será de 87,7 anos para homens e 92,5 para mulheres ao passo que nos países em desenvolvimento, será de 82 e de 86 anos, respectivamente (Fnuap-IBGE, 2007-<http://www.ibge.gov.br>). Concomitante a esse aumento, as causas de morte também se modificaram, com as doenças infecciosas dando lugar para doenças cardiovasculares, câncer, diabetes melito, Alzheimer e Parkinson (KATIC & KAHN, 2005; ARUMUGAM *et al*, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – <http://www.who.int>), mais de 180 milhões de pessoas no mundo sofrem de diabetes melito e este número poderá duplicar dentro de 15 anos. Estima-se que as desordens neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, afetam 20 milhões de indivíduos em todo o mundo e a incidência destas doenças relaciona-se com o aumento da expectativa de vida da população (MAYEUX, 2003). Esta evolução demográfica tem aumentado a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas para promover um envelhecimento adequado, definido como baixa probabilidade de doenças, alta capacidade cognitiva e física e compromisso ativo na vida (LE FUR *et al*, 2002).

Estudos biológicos, epidemiológicos e demográficos geraram inúmeras teorias na tentativa de identificar a causa ou o processo do envelhecimento (WEINERT & TIMIRAS, 2003). Porém, as diferentes teorias não são exclusivas e se sobrepõem, pois operam em diversos níveis de organização funcional. As teorias formuladas para explicar o envelhecimento têm sido agrupadas em categorias:

celular, molecular e de sistemas, as quais, em geral, indicam quatro processos fisiológicos importantes para a longevidade: estabilidade genética, encurtamento do telômero, resistência a estresse e controle do metabolismo (KATIC & KAHN, 2005). De acordo com a teoria do envelhecimento programado, o envelhecimento depende do relógio biológico que regula o plano de duração da vida ao longo de todos os estágios do crescimento, desenvolvimento, maturidade e idade avançada. Esta regulação dependeria dos genes, que ligam e desligam seqüencialmente sinais dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, responsáveis pela manutenção da homeostasia celular, bem como da ativação de respostas defensivas. Dentro da categoria celular encontra-se a teoria dos radicais livres, proposta por Harman, em 1956, que sugeriu que a formação de radicais livres durante o metabolismo aeróbio causa dano oxidativo cumulativo, existindo uma diminuição da capacidade de degradação de moléculas oxidadas, alteração do DNA mitocondrial e redução das defesas antioxidantes, resultando em envelhecimento e, por fim, na morte. Os radicais livres podem reagir e potencialmente danificar as macromoléculas das células como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (HARMAN, 1956, 1992). A oxidação de proteínas, em geral, desequilibra o metabolismo celular e as vias de sinalização. A lipoperoxidação prejudica a sinalização celular e a regulação iônica da membrana. Esta teoria é bem sustentada devido aos elevados níveis de dano a proteínas, à membrana lipídica e ao DNA encontrados em diversas estruturas de animais velhos (VALKO *et al*, 2007). Na categoria molecular, o dano ao DNA leva a mutações que resultam na desregulação da expressão gênica ou na produção anormal de proteínas. O aumento do dano oxidativo no sistema nervoso central relacionado com a idade foi associado ao aumento da lipoperoxidação, do dano protéico e das modificações oxidativas do DNA mitocondrial e nuclear (SIQUEIRA *et al*, 2005 a, b; HAMILTON *et al*, 2001). O aumento dos radicais de oxigênio e das espécies reativas de oxigênio no envelhecimento relaciona-se com o processo de neurodegeneração e com o declínio cognitivo (BERR *et al*, 2000; SERRANO & KLANN, 2004; HU *et al*, 2006). Além do aumento do dano oxidativo relacionado com o envelhecimento em diversas estruturas do SNC, há uma diminuição das defesas antioxidantes, o que também está relacionado com o déficit cognitivo (SIQUEIRA *et al*, 2005 a, b; BERR *et al*, 2000).

Na teoria dos sistemas, o envelhecimento está relacionado com o declínio da função de sistemas essenciais para o controle e manutenção de outros órgãos e sistemas e para a habilidade do organismo de comunicar-se e adaptar-se com o meio no qual vive. Dentro desta categoria há a teoria neuroendócrina, que propõe que as mudanças das funções neuronais e endócrinas são cruciais para: 1) comunicação e responsividade coordenada entre todos os sistemas em relação ao ambiente externo; 2) programação de respostas fisiológicas ao estímulo externo e 3) manutenção de um funcionamento ideal para a reprodução e a sobrevivência (WEINERT & TIMIRAS, 2003).

Nos indivíduos velhos, as mudanças endócrinas resultam em declínio das funções relacionadas com a responsividade tecidual assim como a redução da secreção de glândulas periféricas. Isto está associado com modificações dos mecanismos centrais que controlam a organização temporal da liberação hormonal, com uma diminuição dos ritmos hormonais, circadianos ou não. Todas as glândulas endócrinas estão sujeitas aos efeitos do envelhecimento e muitas funções endócrinas estão tão interligadas que a redução funcional de uma glândula afeta desfavoravelmente as demais. Com o envelhecimento, há uma redução da capacidade de síntese protéica, declínio das funções imunológicas, aumento da massa gorda, diminuição da massa muscular e força, diminuição da densidade mineral óssea, resistência à insulina, risco cardiovascular e depressão. As variações individuais na redução das habilidades cognitivas e o desenvolvimento de desordens afetivas e doenças neurodegenerativas com o envelhecimento sugerem que a deterioração não é apenas o resultado da idade por si só e provavelmente representa uma falha na adaptação a mudanças homeostáticas associada com o envelhecimento (MATTSON & MAGNUS, 2006). Esse declínio da habilidade de resistir e responder às alterações homeostáticas relaciona-se com três sistemas hormonais, os quais têm seus níveis hormonais diminuídos com o envelhecimento: estrogênio (menopausa) e testosterona (andropausa), DHEA e DHEAS (adrenopausa) e o eixo do hormônio de crescimento (GH) /IGF-I (somatopausa) (LAMBERTS *et al*, 1997; CHAHAL & DRAKE, 2007). As modificações dos níveis hormonais com o envelhecimento podem gerar um impacto negativo no sistema nervoso. Em humanos, esta mudança está associada com a progressão de

desordens neurodegenerativas e com o aumento de sintomas depressivos (AZCOITIA *et al*, 2003; SONNTAG *et al*, 2005). Por outro lado, tendo em vista que o encéfalo é um importante centro de controle endócrino, o encéfalo envelhecido também pode estar envolvido nas alterações hormonais.

Estudos realizados em diversos organismos, incluindo nematódios, pássaros e roedores, evidenciaram que a sinalização celular *insulin-like* no sistema nervoso pode controlar a duração da vida, talvez por modular a resposta ao estresse e o metabolismo energético. Interessantemente, a restrição calórica em roedores é associada à maior duração da vida, com o aumento do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da sinalização celular PI3-K/Akt no encéfalo e aumento da sensibilidade periférica à insulina, sugerindo um mecanismo pelo qual o encéfalo controla seu tempo de vida (MATTSON, 2002).

Insulina e fatores semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II) representam a família de hormônios/fatores de crescimento que regulam o metabolismo, o crescimento, a diferenciação celular e a sobrevivência em diversos tecidos de mamíferos. Estes efeitos são mediados por dois receptores similares próximos, receptor de insulina e receptor de IGF tipo I, ambos expressos na membrana celular. Estes receptores estão presentes no músculo esquelético, fígado, tecido adiposo, mas também em células endoteliais e sistema nervoso central (HAVRANKOVA *et al*, 1978). O IGF-I é produzido no fígado e outros órgãos em resposta ao GH e exerce efeitos hormonais, parácrinos e autócrinos em diferentes tecidos, inclusive o sistema nervoso. Tanto IGF-I como seu receptor estão presentes no encéfalo e exercem importantes funções no desenvolvimento e funções neuronais. O RNAm do IGF-I foi encontrado no bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, estriado e córtex de ratos adultos jovens (GARCIA-SEGURA *et al*, 1991; WERTHER *et al*, 1990).

Existe grande similaridade entre os sistemas de sinalização da insulina e do IGF-I em leveduras, vermes, mosca, mamíferos e humanos e isto sugere que este sistema surgiu no início da evolução e que é um componente central de um sistema antienvhecimento, o qual é conservado desde leveduras até o ser humano, regulando a resistência ao estresse oxidativo, o metabolismo, a ingestão alimentar e a duração da vida. Além disso, a complexidade da via insulina/IGF-I aumentou com

a evolução, por exemplo, moscas e pássaros possuem apenas um receptor para ambos (KATIC & KAHN, 2005).

No SNC, o IGF-I atua como um fator trófico durante o desenvolvimento e como um neuromodulador na vida adulta. Os receptores de IGF-I se expressam amplamente no encéfalo adulto e o IGF-I regula vários eventos funcionais, como a neurogênese, a plasticidade sináptica, o aprendizado e a memória. O IGF-I também participa na resposta do tecido nervoso à injúria e à neurodegeneração (TORRES-ALEMAN, 1999; ZHENG *et al*, 2000). IGFs são potentes agentes neurotróficos, cuja expressão aumenta após injúria e que protegem os neurônios do hipocampo contra a toxicidade amilóide e outras toxinas (DORE *et al*, 1997). O aumento do IGF-I no encéfalo poderia promover a sobrevivência neuronal e a longevidade (COLE & FRAUTSCHY, 2007).

Os níveis de IGF-I e de seu receptor do tipo I diminuem em diversas regiões do encéfalo durante o envelhecimento normal (SONNTAG *et al*, 1999). A administração de IGF-I em animais velhos pode aumentar a taxa de utilização de glicose em torno de 11-14% no córtex, na região CA1 do hipocampo e no núcleo arqueado do hipotálamo, amenizando a redução da utilização de glicose associada com o envelhecimento (LYNCH *et al*, 2001). No encéfalo, a insulina atua como uma molécula neuroendócrina e neuromodulatória, participando do crescimento e sobrevivência neuronal (GASPARINI & XU, 2003).

A hiperglicemia crônica da diabetes determina a superprodução de radicais livres e isto contribui para as complicações fisiopatológicas desenvolvidas na doença, envolvendo doenças cardíacas, retinopatia e dano em nervos periféricos e sistema nervoso central (van DAM *et al*, 1995, ARAGNO *et al*, 1999, 2000, 2002, 2006). A diabetes melito está associada com déficits cognitivos moderados e com alterações neurofisiológicas e estruturais no encéfalo, uma condição que pode ser chamada de encefalopatia diabética (BIESSELS *et al*, 2002; ARVANITAKIS *et al*, 2004). O IGF-I é um fator neurotrófico relacionado com a patogênese das desordens neurológicas da diabetes (ISHII, 1995). Tan & Baxter, 1986, encontraram baixos níveis circulantes de IGF-I (redução de 50%) em pacientes diabéticos do tipo 1 e 2. A expressão gênica do IGF-I diminuiu no encéfalo e em nervos periféricos de ratos diabéticos tipo 1 e 2 (ISHII *et al*, 1994; WUARIN *et al*, 1994). Além disso, a perda da

atividade IGF-I em animais não diabéticos pode mimetizar os sintomas dos distúrbios neurológicos da diabetes (LUPIEN *et al*, 2003).

A expressão do receptor de insulina no córtex frontal diminui nos ratos diabéticos do tipo 1, mas não no tipo 2. Porém, há diminuição do receptor de IGF-I nos dois modelos experimentais quando comparados com o grupo controle, assim como há redução da Akt fosforilada e da GSK3 $\beta$  fosforilada (LI *et al*, 2007).

Em hipocampo de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, a redução do desempenho cognitivo foi associada com alteração da plasticidade hipocampal e estas mudanças foram revertidas com a administração de insulina (BIESSELS *et al*, 1998). Em modelo de ratos pré-diabéticos BB/WOR, houve disfunção cognitiva progressiva e esta estava associada com a supressão das ações da insulina e do IGF-I e com a apoptose dos neurônios do hipocampo (LI *et al* 2002). O tratamento com DHEA diminui o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a redução das defesas antioxidantes induzidos pela diabetes no hipocampo e estas alterações estão relacionadas com a redução da ativação do NF- $\kappa$ B. Este é ativado por exposição ao estresse oxidativo crônico e seria responsável pelo dano e pela morte neuronal relacionados com a diabetes (ARAGNO *et al*, 2002). O estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia crônica em homogeneizados de fígado, de rins e de encéfalo de ratos diabéticos também é reduzido com o tratamento crônico com DHEA (ARAGNO *et al*, 1999). O tratamento com DHEA diminuiu o desequilíbrio oxidativo induzido por isquemia transitória seguida de reperfusão em sinaptossomas obtidos do encéfalo de ratos diabéticos e normoglicêmicos (ARAGNO *et al*, 2000). Portanto, o efeito antioxidante da DHEA, nestes estudos, poderia promover neuroproteção contra o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia crônica, em modelos de ratos diabéticos.

DHEA e DHEAS são os hormônios esteróides mais abundantes e apresentam efeitos cardioprotetores, antidiabéticos, antiobesidade e produzem melhora da função imunológica. Além disso, sugere-se que DHEA e DHEAS têm ação neuroprotetora em diversos modelos experimentais (BAULIEU & ROBEL, 1998; BAULIEU *et al*, 2000). Estes hormônios exercem efeitos neuroprotetores *in vitro* e *in vivo* em modelos de isquemia cerebral, hiperglicemia, estresse oxidativo e substâncias citotóxicas (ARAGNO *et al*, 1999, 2000, 2002; BASTIANETTO *et al*, 1999; MAO & BARGER, 1998; LI *et al* 2001; XILOURI & PAPAZAFIRI, 2006). Devido

a suas propriedades antienvhecimento, sugeriu-se o seu papel como hormônio da juventude (BAULIEU,1996). Diferentemente da síntese do cortisol, que não é afetada pelo envelhecimento, a principal mudança relacionada com a idade no córtex da supra-renal humana é a diminuição da biossíntese de DHEA e DHEAS (ORENTREICH *et al*, 1992; LABRIE, 1997). O nível sanguíneo de DHEA, a maior parte circulante na forma DHEAS, atinge o pico aos 20 anos e declina rapidamente e marcadamente após os 25 anos. Em torno dos 80 anos, os níveis de DHEA são 10-20% menores do que a concentração presente nos jovens. Estudos transversais descrevem uma associação entre o declínio de DHEAS e doenças cardiovasculares, câncer de mama, baixa densidade mineral óssea, depressão, diabetes do tipo 2 e Alzheimer. Estas descobertas levaram à popularização da DHEA nos Estados Unidos, onde este hormônio é disponível como um suplemento alimentar, assim como na Europa. Embora sejam recomendadas doses diárias em torno de 10 a 50 mg/dia, a DHEA também é vendida em tabletes de 100, 200 e até mesmo 400 mg e doses de até 1600mg são usadas. Muito se questiona à respeito da administração de DHEA revertendo os efeitos do envelhecimento pois há viabilidade comercial, difundida fora da rede farmacêutica, sem evidência científica adequada (ALLOLIO & ARLT, 2002; GURNELL & CHATTERJEE, 2001). A ciência até agora não encontrou a pílula mágica para reverter o processo do envelhecimento e a questão do hormônio da juventude ainda continua (CHAHAL & DRAKE, 2007).

A DHEA é sintetizada principalmente no córtex da supra-renal e transformada pela sulfatransferase na própria glândula e no fígado em DHEAS, um “reservatório” circulante de DHEA (RAVAGLIA *et al*, 1996). DHEA e DHEAS foram os primeiros esteróides identificados no encéfalo de ratos adultos mesmo após gonadectomia e adrenalectomia, como anteriormente citado (CORPECHOT *et al*, 1981; 1983). O RNA mensageiro para P450c17, enzima que converte a 17-hidroxi pregnenolona em DHEA, foi encontrado em cultura celular de astrócitos e de neurônios de roedores (STRÖMSTEDT & WATERMAN, 1995; ZWAIN & YEN, 1999 a,b). Astrócitos e neurônios do córtex cerebral e hipotálamo, em cultura, podem sintetizar DHEA a partir da PREG, mas esta síntese é inibida na presença da microglia (ZWAIN & YEN, 1999a, AKWA *et al*, 1993). Astrócitos e neurônios do córtex cerebral de ratos neonatais expressam P450c17 e sintetizam DHEA a partir de PREG. Entretanto, os

neurônios corticais produzem níveis baixos de DHEA e de androstenediona comparados com os astrócitos (ZWAIN & YEN, 1999a). Astrócitos hipotalâmicos produzem DHEA numa quantidade 3 vezes maior do que aquela produzida por astrócitos corticais (ZWAIN & YEN, 1999a). Tanto astrócitos corticais como hipotalâmicos possuem a capacidade de metabolizar a DHEA a testosterona e a estradiol (ZWAIN & YEN, 1999a). As altas taxas de produção e de metabolismo da DHEA em astrócitos hipotalâmicos sugerem que este hormônio esteja envolvido na regulação da função neuronal hipotalâmica, particularmente em neurônios que secretam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (ZWAIN & YEN, 1999a). Hojo e colaboradores, 2004, encontraram P450c17 no hipocampo de ratos adultos, contrapondo um estudo anterior que encontrou esta enzima em neurônios específicos do encéfalo de roedores, apenas no período embrionário (COMPAGNONE *et al*, 1995).

Por outro lado, a DHEA também pode ser produzida no SN por uma reação química que não requer a presença da P450c17 e que envolve a formação de hidroperóxidos. Esta hipótese está baseada na observação de que a DHEA pode ser sintetizada de forma independente da P450c17 e dependente de  $Fe^{2+}$  em cultura de oligodendrócitos e de astrócitos de ratos (CASCIO *et al*, 2000). Porém, é improvável que isto ocorra *in vivo* pois a concentração de ferro necessária para induzir a produção de DHEA nas células que não possuem P450c17 está fora dos padrões fisiológicos (COMPAGNONE & MELLON, 2000). O tratamento de oligodendrócitos com o peptídeo beta-amilóide, o qual aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), também aumenta a síntese de DHEA (BROWN *et al*, 2000). Este dado sugere que a síntese local de DHEA por células gliais em resposta a ERO e peptídeo beta-amilóide pode desempenhar um papel importante na sobrevivência neuronal (SCHUMACHER *et al*, 2003).

A barreira hematoencefálica é permeável à DHEA. Porém, seu conjugado sulfatado é hidrofílico e, ao contrário da DHEA, não atravessa a barreira. Portanto, a formação de compostos sulfatados provavelmente ocorra no próprio SN (SCHUMACHER *et al*, 2000).

DHEA e DHEAS estão envolvidas em diversas atividades funcionais no SNC e SNP, participando do crescimento de neuritos, atuando na neuroproteção contra

danos provocados por aminoácidos excitatórios e situações citotóxicas induzidas por estresse oxidativo, isquemia-reperfusão e hiperglicemia. A DHEA também pode ter ação antioxidante e promover a sobrevivência neuronal inibindo a apoptose (ARAGNO *et al*, 1999, 2000, 2002; BASTIANETTO *et al*, 1999; XILOURI *et al*, 2007; KARISHMA & HERBERT, 2002; KAASIK *et al*, 2001; LI *et al*, 2001; BUCOLO *et al*, 2005).

O pré-tratamento com DHEA (10-100mM) em cultura celular primária de células hipocâmpais de rato protege contra a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio e nitroprussiato de sódio. Além disso, nestas mesmas concentrações, DHEA também evitou a oxidação lipídica por peróxido de hidrogênio/sulfato de ferro tanto em tecidos hipocâmpais de pacientes com a doença de Alzheimer como também do grupo controle (BASTIANETTO *et al*, 1999). Portanto, este dado sugere que o tratamento com DHEA em doenças neurodegenerativas associadas com a idade poderia ser neuroprotetor.

Todavia, os mecanismos através dos quais DHEA e DHEAS exercem seus efeitos ainda não foram plenamente esclarecidos. Estes esteróides modulam a função de receptores de membrana para neurotransmissores, tais como NMDA, GABA<sub>A</sub> e receptores sigma (SCHUMACHER *et al*, 2000; BAULIEU & ROBEL, 1998). Foi demonstrado que a DHEA e a DHEAS modulam a neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica. A neuroproteção induzida por DHEAS poderia ser atribuída à modulação do receptor GABA<sub>A</sub> (SOUSA & TICKU, 1997). O efeito da DHEA na neurogênese parece ser mediado via receptores NMDA, pois o tratamento com DHEA em neurônios neocorticais causa um aumento sustentado do cálcio intracelular, podendo potencializar os efeitos do NMDA (MELLON *et al*, 2001). O tratamento agudo com DHEA via injeção intratecal em ratos com lesão do nervo ciático tem ação pronociceptiva e tal fato parece ser mediado via receptores sigma-1, pois com a presença de um antagonista para este receptor o efeito da DHEA foi abolido (KIBALY *et al*, 2008). Liu e Dillon (2002) caracterizaram um sítio de ligação específico para DHEA na membrana plasmática de células endoteliais de aorta bovina. O tratamento com DHEA de células endoteliais de vasos bovinos e de humanos aumentou a produção de óxido nítrico e a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), inibiu a apoptose, e tais efeitos foram mediados por proteínas

de membrana acopadas à proteína G (LIU *et al*, 2007; LIU & DILLON, 2004). Sítios de ligação intracelulares específicos para DHEA também foram encontrados em linfócitos T de camundongos e de humanos (MEIKLE *et al*, 1992; OKABE *et al*, 1995), na musculatura lisa vascular humana (WILLIAMS *et al*, 2002) e no fígado de rato (KALIMI & REGELSON, 1988). Porém, um receptor nuclear específico para este hormônio nunca foi convincentemente identificado (WIDSTROM & DILLON, 2004).

DHEA e DHEAS exercem funções diferentes no crescimento de neuritos, em neurônios em cultura preparados a partir do córtex cerebral de camundongos embriões. Enquanto DHEA aumenta a extensão axonal, DHEAS aumenta o crescimento de dendritos. Este efeito pode explicar a habilidade da DHEA de aumentar a comunicação neuronal no encéfalo pelo aumento de processos neuronais, reforçando a conexão entre os neurônios, e aumentando a sobrevivência e a diferenciação neuronal e glial, fator importante para seus efeitos na cognição e no aprendizado (COMPAGNONE & MELLON, 2000,1998). O tratamento de ratas ovariectomizadas com DHEA, 1mg/dia, durante dois dias, aumentou a formação de espinhos dendríticos em neurônios do hipocampo (HAJSZAN *et al*, 2004).

A primeira evidência de que a DHEA poderia atuar como neuroprotetora, foi feita por Roberts e colaboradores, 1987, demonstrando seu papel preventivo na morte neuronal em culturas cerebrais e induzindo a diferenciação de astrócitos. Em modelos de isquemia cerebral e da medula espinal, DHEA reduziu a injúria neuronal e glial (MALIK *et al*, 2003). DHEA e DHEAS também protegem culturas neuronais hipocampais contra a neurotoxicidade mediada por glutamato (CARDOUNEL *et al*, 1999; DUBROVSKY, 2005). Mao e Barger, 1998, mostraram que a DHEAS protege neurônios hipocampais contra a neurotoxicidade induzida por glutamato, enquanto pouca proteção é obtida com doses equivalentes de DHEA. Em culturas primárias de hipocampo, DHEA protegeu neurônios contra a toxicidade induzida por NMDA (KIMONIDES *et al*, 1998). Em estudos realizados *in vivo*, implantes subcutâneos de DHEA protegem neurônios hipocampais contra a infusão unilateral de NMDA (KIMONIDES *et al*, 1998). DHEA também protege os neurônios dos efeitos tóxicos induzidos por corticosterona (KIMONIDES *et al*, 1999). O tratamento de ratos adultos com DHEA estimula a proliferação de neurônios granulares dentro da formação

hipocampal por antagonizar os efeitos inibitórios dos glicocorticóides (KARISHMA & HERBERT, 2002).

Em cultura primária de células granulosas cerebelares de ratos, DHEAS evitou o dano induzido pela privação de oxigênio e glicose. Esse efeito foi mais proeminente quando a DHEAS foi adicionada 48 horas antes da indução da injúria. Além disso, foi também observado proteção parcial contra a toxicidade induzida por NMDA, colchicina, 1-metil-fenil-piridina e glutamato. DHEAS diminuiu as características apoptóticas (fragmentação do DNA e condensação e fragmentação nuclear). Porém, a ação neuroprotetora foi inibida quando o agonista GABA<sub>A</sub> (pentobarbital) e o antagonista (picrotoxina) GABA<sub>A</sub> foram acrescentados (KAASIK *et al*, 2001).

Análogos sintéticos de neuroesteróides endógenos, como alopregnenolona e DHEA, inibem a morte celular induzida por excitotoxicidade ao NMDA em células neuronais P-19 de camundongos (XILOURI *et al*, 2007). A apoptose induzida por NMDA é um evento que desempenha um papel fisiopatológico importante no SNC após trauma, acidente vascular e em muitas doenças neurodegenerativas (ARUNDINI & TYMIANSKI, 2004). O pré-tratamento (2h) com DHEA protege as células epiteliais da retina contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. O dano ao DNA induzido pelo estresse oxidativo foi menor com o pré-tratamento (BUCOLO *et al*, 2005).

Em um modelo de isquemia cerebral por 10 minutos, o implante subcutâneo de DHEA, 12 dias antes do procedimento para isquemia, e análise após 7 dias da região hipocampal que sofreu injúria, não apresentou diferença entre os grupos tratados nas doses de 25mg e 50 mg comparados com o grupo placebo. Porém, na doses de 100mg houve uma redução da injúria neuronal da área hipocampal CA1 (LI *et al*, 2001). Estes achados sugerem que os neurosteróides podem servir como neuroprotetores endógenos contra a neurotoxicidade aguda ou crônica, atuando em conjunto com diversos mecanismos para evitar e ou proteger neurônios da morte celular.

DHEA em cultura de precursores neuronais embriogênicos, oriundos do prosencéfalo de ratos, promove uma diminuição da apoptose enquanto a DHEAS aumenta a apoptose. Estes dados sugerem que durante a neurogênese no

desenvolvimento do córtex, DHEA e DHEAS regulam a sobrevivência neuronal (ZHANG *et al*, 2002). Porém, um outro estudo utilizando células neuronais hipotalâmicas GT1-7, um modelo de neurônios GnRH, privadas de soro, a DHEA induziu apoptose (LIN *et al*, 2004).

Altas concentrações de DHEA (concentrações micromolares) podem ter efeitos neurotóxicos e estes efeitos foram mediados pela inibição do complexo um da cadeia respiratória mitocondrial (SAFIULINA *et al*, 2006). O padrão de neurotoxicidade produzido por DHEA foi similar aos produzidos por componentes inibitórios do complexo I, pois como estes, a DHEA prejudicou o metabolismo energético em neurônios em cultura primária de células granulares cerebelares, células mesencefálicas e corticais de ratos neonatais e induziu a morte neuronal. Além disso, a adição de DHEA 0,6% na dieta de camundongos com 3 meses de idade durante 3 meses (média 14mg/camundongo/dia) levou à perda neuronal no córtex cerebral e hipocampo e induziu déficits cognitivos (SAFIULINA *et al*, 2006). Este estudo sugere que o uso prolongado de altas doses de DHEA poderia produzir forte inibição do complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial no encéfalo de humanos e, portanto, promover alterações neurotóxicas. Dessa forma, são necessários estudos epidemiológicos para verificar se o uso prolongado de altas doses de DHEA estaria associado a complicações neurológicas. Portanto, as concentrações de DHEA podem ser cruciais na promoção da neuroproteção versus neurotoxicidade (MELLON, 2007).

Os efeitos da DHEA e DHEAS podem ser mediados tanto por sua conversão em androgênios e em estrogênios como por ação direta em neurônios e células gliais (SCHUMACHER *et al*, 2000; ZWAIN & YEN, 1999 a,b). Alguns efeitos da DHEA podem ser bloqueados pelo uso de inibidores da aromatase, enzima que dá origem ao estradiol a partir de androgênios, sugerindo que estes efeitos seriam mediados pelo estradiol (VEIGA *et al.*, 2003). Em neurônios do hilo do hipocampo de ratos induzidos à morte neuronal por ácido caínico, a DHEA exerceu um efeito protetor. Porém, este efeito foi abolido na presença de fadrozole, um inibidor da aromatase, bloqueando a formação de estradiol (VEIGA *et al*, 2003). O tratamento de ratas ovariectomizadas com DHEA, 1mg/dia, durante dois dias, aumentou a formação de espinhos dendríticos em neurônios do hipocampo. Todavia, este efeito

da DHEA foi mediado por sua aromatização em estradiol tendo em vista que o inibidor da enzima, letrozole, inibiu o efeito da DHEA (HAJSZAN *et al*, 2004).

O estradiol regula a expressão gênica, a sobrevivência neuronal e glial e a transmissão sináptica (McEWEN, 2002). O estradiol tem efeitos neuroprotetores e propriedades reparadoras e evita a perda neuronal e cognitiva em diversos modelos experimentais de neurodegeneração (GARCIA-SEGURA *et al*, 2001). Tratamento prolongado com altas concentrações de 17- $\beta$  estradiol protege a formação hipocampal, os núcleos da base e a amígdala, de ratos machos e fêmeas recém-nascidos, contra o dano induzido por hipóxia-isquemia (NUÑEZ *et al*, 2007). Assim como em outros tecidos, os efeitos do estradiol no SN podem ser exercidos pela ativação dos receptores nucleares  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). Além disso, ele pode desempenhar ações rápidas no SN pela interação com compartimentos da membrana plasmática e citoplasma em neurônios e em células gliais (BEYER *et al*, 2003, KELLY *et al*, 2002). Por outro lado, as ações neuroprotetoras deste esteróide podem estar relacionadas com sua propriedade antioxidante (BEHL, 2002). No músculo cardíaco de ratas castradas, o aumento da lipoperoxidação estava relacionado com a redução dos níveis de estrogênio. Porém, a lipoperoxidação no músculo cardíaco de ratos machos castrados, não sofreu alteração. Assim, o estresse oxidativo pode estar relacionado com o gênero e com as diferentes concentrações de hormônios secretados pelas gônadas (BARP *et al*, 2002). Um dos fatores que pode regular a sinalização do estradiol é o IGF-I, um dos hormônios que declinam com a idade. No encéfalo, há uma abundante coexpressão de receptores para estrogênio e receptores para IGF-I na mesma célula e ambos cooperam na neuroproteção, em modelo excitotóxico de injúria hipocampal *in vivo* e em modelos experimentais da doença de Parkinson (MENDEZ *et al*, 2005). O receptor de estrogênio  $\alpha$ , num processo dependente do hormônio, pode fisicamente interagir com o receptor de IGF e com as proteínas da cascata abaixo do substrato do receptor de insulina e PI3-K, aumentando a sinalização IGF-I no encéfalo (MENDEZ *et al*, 2005). As ações neuroprotetoras do estradiol podem ser em parte mediadas pela ativação, via cascata de sinalização do receptor IGF-I, da cinase antiapoptótica Akt. O estradiol também regula a interação do receptor  $\alpha$  com GSK3 e  $\beta$ -catenina, uma outra molécula envolvida na regulação da sobrevivência neuronal e

reorganização do citoesqueleto. Além disso, o estradiol controla a interação das proteínas Tau associadas com os microtúbulos, como GSK3 $\beta$  e elementos da PI3-K (subunidade 85), e reduz a hiperfosforilação Tau, um dos marcadores moleculares da doença de Alzheimer (CARDONA-GOMEZ *et al*, 2004). Em parte, as propriedades neuroprotetoras do estradiol são mediadas por receptores de estrogênio, que estão expressos em diferentes regiões do encéfalo, mas não exclusivamente em neurônios (SHUGHRUE *et al*, 1997). Além disso, o estradiol tem efeito rápido em neurônios, o que pode estar relacionado a formas de receptores estrogênicos de membrana ou com a associação dos receptores intracelulares clássicos com compartimentos membranosos específicos (TORAN-ALLERAND *et al*, 2002). Efeitos rápidos do estradiol na membrana incluem a ativação de vias de sinalização acopladas com receptores tirosina-quinases (CARDONA-GOMEZ *et al*, 2002; ZHANG *et al*, 2001). Em neurônios do hipocampo de ratos submetidos à neurotoxicidade por beta-amilóide, o estrogênio tem efeito protetor pela ativação da Akt (ZHANG *et al*, 2001). No hipotálamo de ratos adultos, a ativação da via PI3-K/Akt ocorre devido à interação do estradiol e do IGF-I (CARDONA-GOMEZ *et al*, 2002). Estradiol e IGF-I interagem no hipotálamo para regular a função neuronal, a plasticidade sináptica e eventos neuroendócrinos. O efeito do estradiol na sinalização do receptor IGF-I no hipotálamo de ratas ovariectomizadas adultas, resulta, entre 6 e 24 horas, na fosforilação da cinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase* – ERK) e da Akt/PKB (CARDONA-GOMEZ *et al*, 2002). De fato, após a ligação com estradiol, o ER $\alpha$  fisicamente e funcionalmente acopla-se com a subunidade regulatória da PI3-K, disparando então uma ativação da subunidade catalítica e aumentando a produção intracelular de fosfoinositóis (SIMONCINI *et al*, 2000). Em neurônios do hipocampo de ratos machos submetidos à isquemia cerebral, o pré- tratamento crônico com estradiol aumentou a ativação da Akt, e tal fato estava relacionado com a ativação da PI3-K pela interação com o ER $\alpha$  (WANG *et al*, 2006). Em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, e submetidas à injúria cerebral pela oclusão da artéria cerebral média por 24 horas, houve fosforilação da Akt e inibição da GSK3 $\beta$ . Além disso, em cultura de células hipocámpais (HT22), o estradiol evitou a diminuição da fosforilação da Akt e da GSK3 $\beta$  induzida pela toxicidade ao glutamato (KOH *et al*,

2006). Portanto, o estradiol desempenha efeito protetor importante contra injúrias encefálicas e a modulação da Akt por este esteróide pode mediar seus efeitos neuroprotetores.

Dessa forma, é possível que o estradiol e a DHEA utilizem mecanismos de sinalização semelhantes, devido tanto às suas semelhanças químicas, como também pela capacidade da DHEA de modular as concentrações de IGF-I, bem como de seus receptores no SNC (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002). Por outro lado, devido ao metabolismo esteroidogênico do SNC, o fato de que a conversão dos esteróides em seus derivados pode ocorrer no local, com diferentes perfis farmacológicos, precisa ser considerado quando se avalia as propriedades clínicas dos esteróides neuroativos.

O entendimento dos mecanismos moleculares através dos quais as ações não-genômicas dos esteróides ocorrem e suas ações são exercidas representa um ponto chave para a elaboração de novas ferramentas farmacológicas para as terapias hormonais e para enriquecer a discussão sobre a relação risco/benefício da reposição hormonal. Além disso, não se conhece completamente quais os mecanismos de ação pelos quais a DHEA exerce suas funções no sistema nervoso central e qual a importância de seus efeitos.

Portanto, a investigação dos efeitos da DHEA sobre a via da Akt pode ser de suma importância para esclarecer os mecanismos de ação que podem estar envolvidos com as suas funções no SNC, como a neuroproteção contra injúrias. Por outro lado, o conhecimento sobre os mecanismos de sinalização que envolvem suas funções pode acrescentar dados importantes para a sua utilização terapêutica e para o desenvolvimento de protocolos adequados de tratamento com DHEA no envelhecimento, na diabetes e em doenças neurodegenerativas, nos quais os processos de neurodegeneração estão presentes em diferentes graus.

## 2. HIPÓTESE

Diante do que foi relatado à respeito da DHEA e de seus efeitos no SNC tanto *in vitro* como *in vivo* e das modificações funcionais do SNC relacionadas com o envelhecimento e com a diabete, este estudo propõe que o tratamento com a DHEA pode modular a via da Akt no hipotálamo e no hipocampo em diferentes modelos experimentais *in vivo*, os quais envolvem maior ou menor dano ao SNC.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração de desidroepiandroterona (DHEA) sobre a modulação da proteína Akt no hipotálamo e no hipocampo de ratos machos em diferentes modelos experimentais, para avaliar um possível mecanismo intracelular pelo qual este esteróide pode exercer suas funções nestas estruturas.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar o efeito do tratamento agudo com DHEA em diferentes concentrações para investigar um possível efeito dependente da dose e do tempo de tratamento na expressão das proteínas Akt fosforilada e da Akt total no hipocampo e no hipotálamo de ratos machos adultos.
- 2) Avaliar o efeito do tratamento crônico com DHEA na expressão das proteínas Akt fosforilada e da Akt total no hipocampo e no hipotálamo de ratos machos adultos e velhos, para avaliar o efeito deste esteróide na modulação da via da Akt no SNC em animais com diferentes idades.
- 3) Avaliar o efeito do tratamento crônico com DHEA na expressão das proteínas Akt fosforilada e da Akt total no hipocampo e no hipotálamo de ratos machos adultos diabéticos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3, 13, 18 e 21 meses de idade provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22-24° C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, em caixas de plástico Plexiglas de 49 x 34 x 16cm, com assoalho contendo maravalha. Os animais foram separados em grupos de no máximo cinco animais por caixa, com livre acesso à ração e água.

Os procedimentos experimentais a que os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br>) e o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 4.2 Protocolo Experimental

O estudo foi subdividido em duas etapas com os seguintes protocolos experimentais:

- 1) Protocolo experimental para o tratamento agudo:
  - 1.1) Agudo 6 horas: ratos com três meses de idade receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) com 1, 5, 10 ou 50 mg/kg de DHEA e foram decapitados após 6 horas.
  - 1.2) Agudo 24 horas: ratos com três meses de idade receberam uma injeção intraperitoneal com 1, 5, 10 ou 50 mg/kg de DHEA e foram decapitados após 24 horas.
- 2) Grupo experimental com tratamento crônico:

- 2.1) Tratamento de animais com diferentes idades : ratos com 3, 13, 18 e 21 meses de idade receberam uma injeção subcutânea de DHEA (10mg/kg) por semana durante 5 semanas.
- 2.2) Tratamento de animais diabéticos: ratos com 3 meses de idade foram induzidos à diabetes com streptozotocina e receberam uma injeção subcutânea DHEA (10mg/kg) por semana durante 5 semanas.

### 4.3. Fármacos

Para os grupos experimentais que receberam tratamento agudo, a desidroepiandrosterona (DHEA) (CALBIOCHEM, San Diego, EUA) foi diluída em solução de  $\beta$ -ciclodextrina (FLUKA, Sigma Aldrich) a 20% em água destilada, constituindo-se quatro diferentes concentrações: 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10mg/kg e 50 mg/kg. Os grupos controle receberam injeção i.p. de solução de  $\beta$ -ciclodextrina a 20%. As soluções foram preparadas no mesmo dia da aplicação das injeções.

Para os grupos experimentais com tratamento crônico, a DHEA foi diluída em óleo vegetal (Salada Especial, Bünge) e administrada na concentração de 10 mg/kg. Os grupos controle receberam apenas óleo em um volume de 0,5 mL/kg.

A diabetes foi induzida por uma única injeção i.p. de estreptozotocina (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) 70 mg/kg (TAKEUCHI *et al.*, 1994). A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5) e injetada até 10 minutos após sua diluição. Os animais controle receberam o mesmo volume de tampão citrato de sódio.

## **4.4 Procedimentos Experimentais**

### **4.4.1 Validação do modelo experimental da Diabetes:**

A glicemia dos animais foi avaliada em duas coletas de sangue. A primeira coleta de sangue foi realizada no quarto dia após a injeção i.p de STZ ou tampão. A segunda coleta de sangue foi realizada no final da quinta semana. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática superior a 250mg/dL (PACKER *et al.*, 2000).

O sangue foi retirado da veia caudal dos ratos e colocado em tubo de ensaio previamente heparinizado para evitar a coagulação. Após, foi realizada centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos para separação do plasma. O plasma foi armazenado para posterior análise da glicemia plasmática. A glicemia foi determinada pelo teste colorimétrico enzimático Glicose PAP Liquiform (Kit Enzicolor, LABTEST Diagnóstica).

### **4.4.2. Sacrifício dos Animais**

Após o término de cada protocolo experimental, os animais foram mortos por decapitação entre 10-12horas da manhã. Os encéfalos foram rapidamente retirados, o hipocampo e o hipotálamo foram dissecados e imediatamente congelados em gelo seco para posteriormente serem homogeneizados e preparados para realizar a técnica de Western Blot.

### **4.4.3. Homogeneização**

Hipocampo e Hipotálamo foram homogeneizados (Homogeneizador tipo Potter-NT, Nova Técnica) em tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 20 mM; EDTA 5mM, Glicerol 10%, NP40 1%) contendo leupeptina a 25 µg/mL e PMSF (fluoreto de

fenil metil sulfonila) na concentração de 1mM em isopropanol. Para a homogeneização do hipocampo e do hipotálamo, utilizou-se 500 $\mu$ L e 250 $\mu$ L de tampão de lise, respectivamente. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 min a 7.000 x g a 4 °C ( Sorval RC 5B-rotor, SS-34, Du Pont Instruments, EUA) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a – 70°C para análises posteriores.

#### **4.4.4. Expressão da Akt pela técnica de Western Blot**

Após quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), foi utilizado o sistema *mini-protein* (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). O homogeneizado foi preparado com tampão de carga (Tris 65mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%) na concentração de 90 $\mu$ g/50 $\mu$ L de proteína. Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse, utilizou-se marcador de peso molecular RPN800 (Amersham Pharmacia). Antes de serem submetidas à eletroforese a 120v por 3 horas, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 2 minutos em banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética). A eletroforese foi efetuada na presença de tampão de corrida, contendo de glicina 192mM, Tris 25mM e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham) e coberto com tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 100v por 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações a proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com albumina bovina (Sigma) a 1% em TTBS (Tris 20mM, NaCl 140mM e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por, no mínimo, 12 horas em agitação constante a 4°C com o anticorpo primário anti-Akt fosforilada (Ser 473) policlonal (coelho) na diluição de 1:500 em

TTBS ou anti-Akt policlonal (cabra) na diluição de 1:1.000, ambos contendo BSA 2,5 % e azida sódica a 1%. Os anticorpos utilizados foram provenientes da Santa Cruz Biotechnology.

A seguir, as membranas foram lavadas com TTBS (três períodos de 10 minutos cada) e incubadas com o segundo anticorpo durante duas horas sob agitação constante em temperatura ambiente na diluição de 1:10.000 em TTBS. Os anticorpos secundários peroxidados utilizados foram anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology) e anti-coelho (Zymed Laboratories). Antes de proceder à revelação por quimiluminescência as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20mM e NaCl 140mM).

A reação de quimiluminescência ocorreu por meio do sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), com exposição das membranas ao filme radiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto, seguido das incubações nas soluções de revelação: revelador, ácido acético (10%) e fixador (1 minuto cada incubação). Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura.

A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador de imagem e quantificador (Image Master VDS, Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas da Akt e da Akt fosforilada foi corrigida por uma banda inespecífica obtida pela coloração com *Red Ponceau S*, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

#### 4.5. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média em valor percentual referente ao grupo controle considerado em cada protocolo experimental. O tamanho amostral de cada grupo está representado nas figuras referentes a cada análise. O cálculo do tamanho amostral foi baseado em um estudo anterior do laboratório (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002) e, a partir de resultados iniciais deste estudo, foi utilizado o programa estatístico PEPI 3,0 que indicou o número de 4 animais em cada grupo experimental com um poder de 80% e nível de significância de 0,05.

Foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via para a análise dos resultados referentes ao experimento agudo de 6 e de 24 horas. Para a análise do tratamento crônico com DHEA em ratos com diferentes idades e em ratos diabéticos, foi realizado ANOVA de duas vias, utilizando-se o tratamento e a idade, e o tratamento e a doença como fatores independentes. Para a análise da glicemia, foi realizado teste t de Student para a primeira coleta e ANOVA de duas vias para a segunda coleta, sendo considerado, neste último caso, o tratamento e a doença como fatores independentes. Foi utilizado o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls. O nível de significância considerado foi de 5% ( $P < 0,05$ ) para se admitir diferenças entre os grupos. O programa Sigma Stat 2.0 foi utilizado como ferramenta computacional para a análise dos dados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Grupos experimentais submetidos ao tratamento agudo

#### 5.1.1. Hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA

No hipocampo de ratos tratados com 50 mg/kg de DHEA houve um aumento na relação Akt fosforilada/Akt total após 6 horas comparando-se com todos os outros grupos. A expressão da proteína Akt fosforilada aumentou na dose de 50 mg/kg comparando-se com o controle e com as doses 1mg/kg e 10mg/kg. Porém, a expressão da Akt total não foi modificada com nenhuma das doses testadas em relação ao controle, nem entre as diferentes doses de DHEA. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

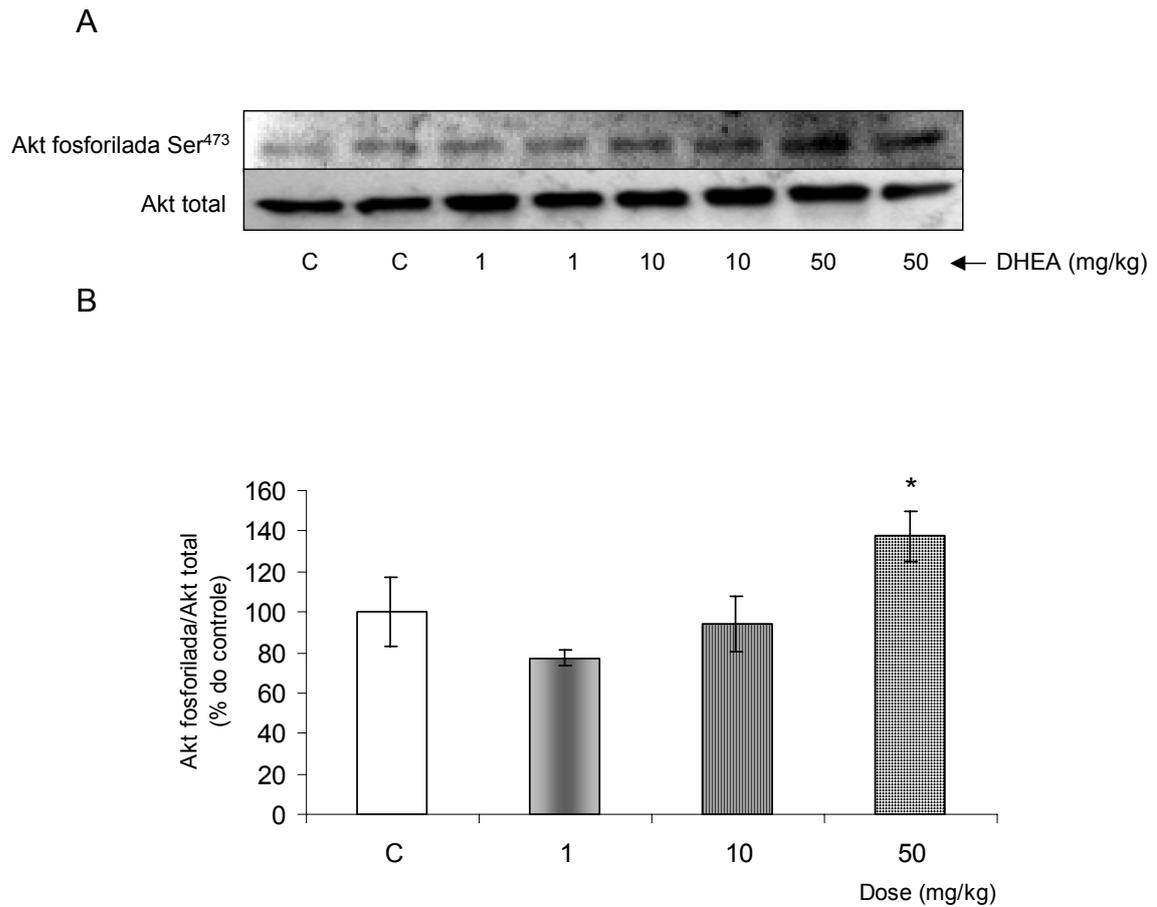
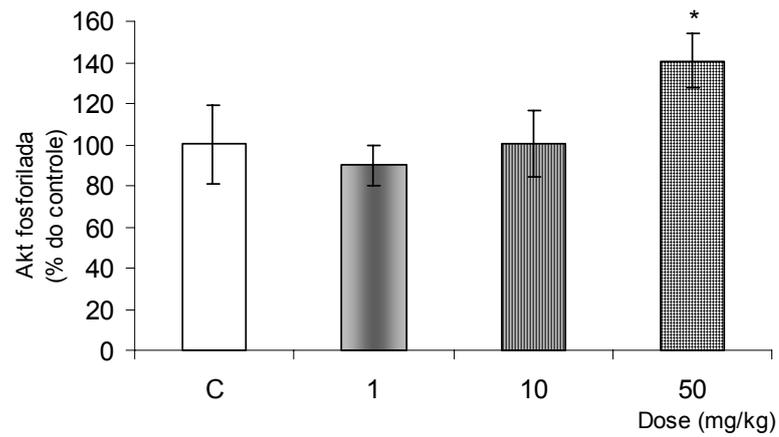


Figura 3: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1= 1 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=3 para C e n=4 para os demais grupos. \* $P < 0,05$  em relação a todos os outros grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newmann Keuls.

A



B

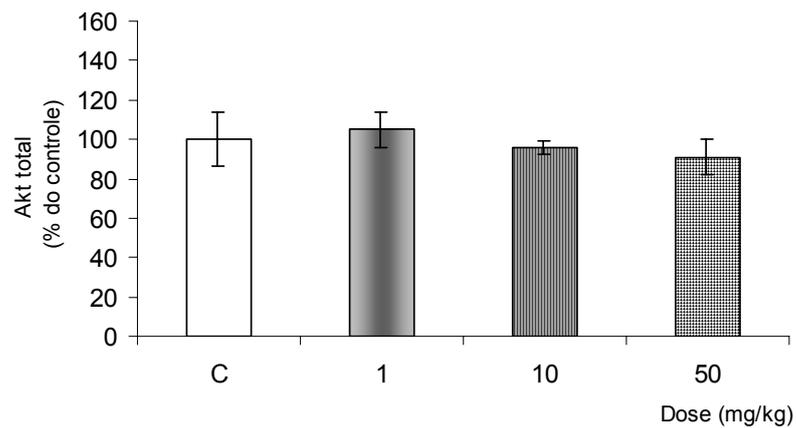


Figura 4: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após 6 horas de tratamento com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1= 1 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=3 para C e n=4 para os demais grupos. \* $P < 0,05$  em relação a todos os outros grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newman Keuls.

### 5.1.2. Hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA

No hipocampo de ratos tratados com 5, 10 ou 50 mg/kg houve um aumento na relação Akt fosforilada/Akt total após 24 horas comparando-se com o grupo controle. A expressão da proteína Akt fosforilada aumentou na dose de 50 mg/kg comparando-se com o controle e com as doses 5mg/kg e 10mg/kg. A expressão da Akt total aumentou na dose de 50 mg/kg comparando-se com o controle, com a dose de 5 mg/kg e com a dose de 10 mg/kg. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

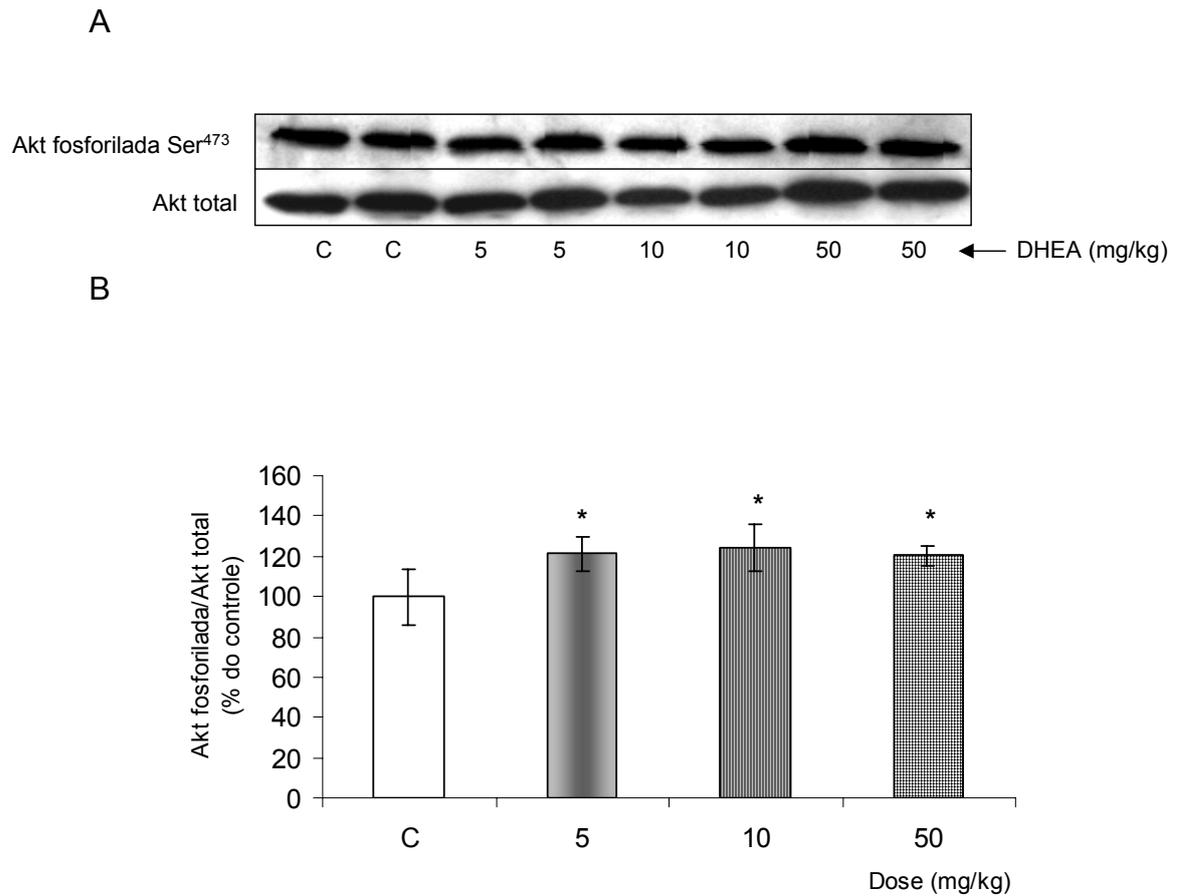
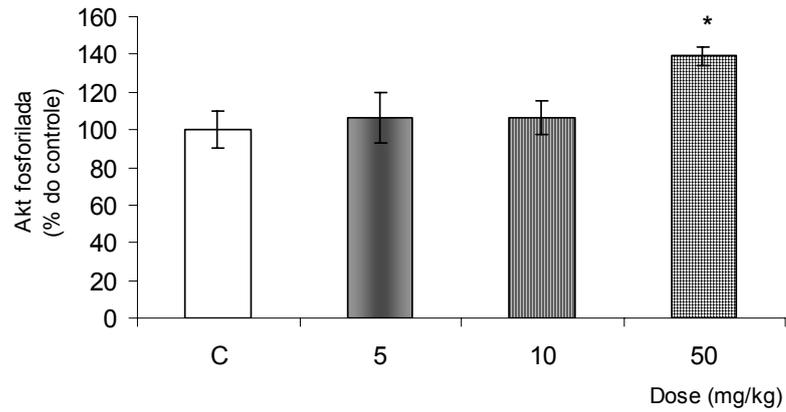


Figura 5: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 5= 5 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. \* $P$ <0,05 em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newmann Keuls.

A



B

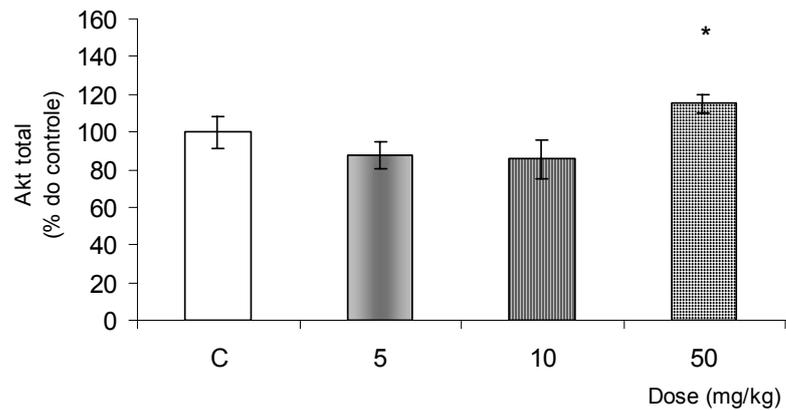


Figura 6: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após 24 horas de tratamento com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 5=5 mg/kg; 10=10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. \* $P<0,05$  em relação a todos os outros grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newman Keuls.

### 5.1.3. Hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA

No hipotálamo de ratos tratados com DHEA, a relação Akt fosforilada/Akt total após 6 horas não foi modificada em nenhuma dose testada. Além disso, a expressão da Akt fosforilada assim como da Akt total também não foi modificada com o tratamento. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 7 e 8.

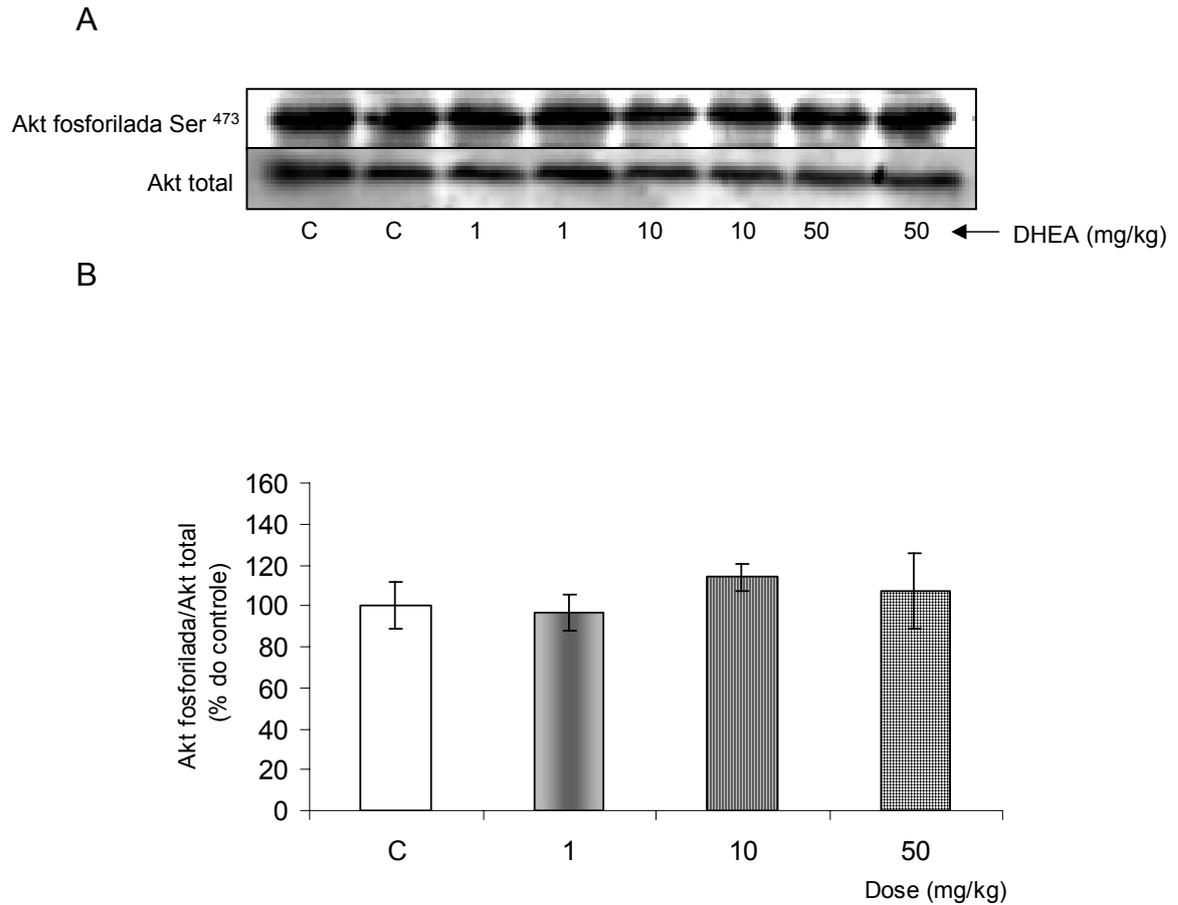
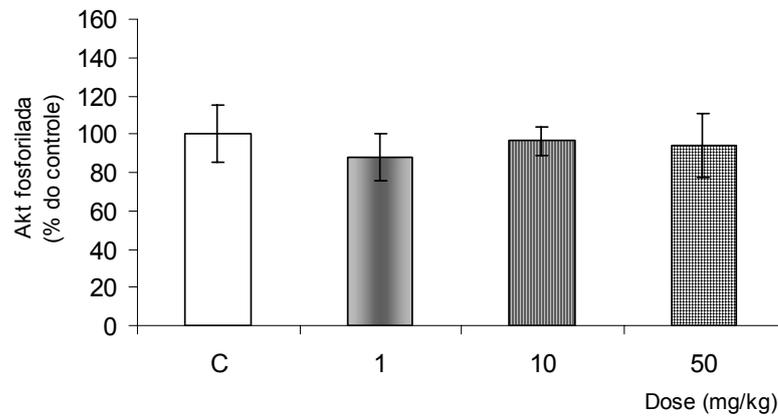


Figura 7: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1= 1 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. ANOVA de uma via.

A



B

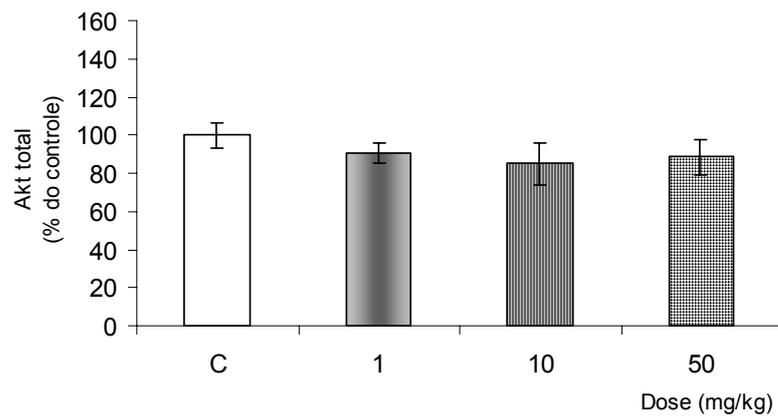


Figura 8: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após 6 horas de tratamento com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1=1 mg/kg; 10=10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. ANOVA de uma via.

#### 5.1.4. Hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA

No hipotálamo de ratos tratados com 50 mg/kg de DHEA, houve um aumento na relação Akt fosforilada/Akt total após 24 horas comparando-se com o grupo controle, com o grupo tratado com 1mg/kg e com o grupo tratado com 10mg/kg. A expressão da proteína Akt fosforilada também aumentou na dose de 50 mg/kg comparando-se com o controle e com as doses 1mg/kg e 10mg/kg. Porém, a expressão da Akt total não foi modificada em nenhuma das doses testadas. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

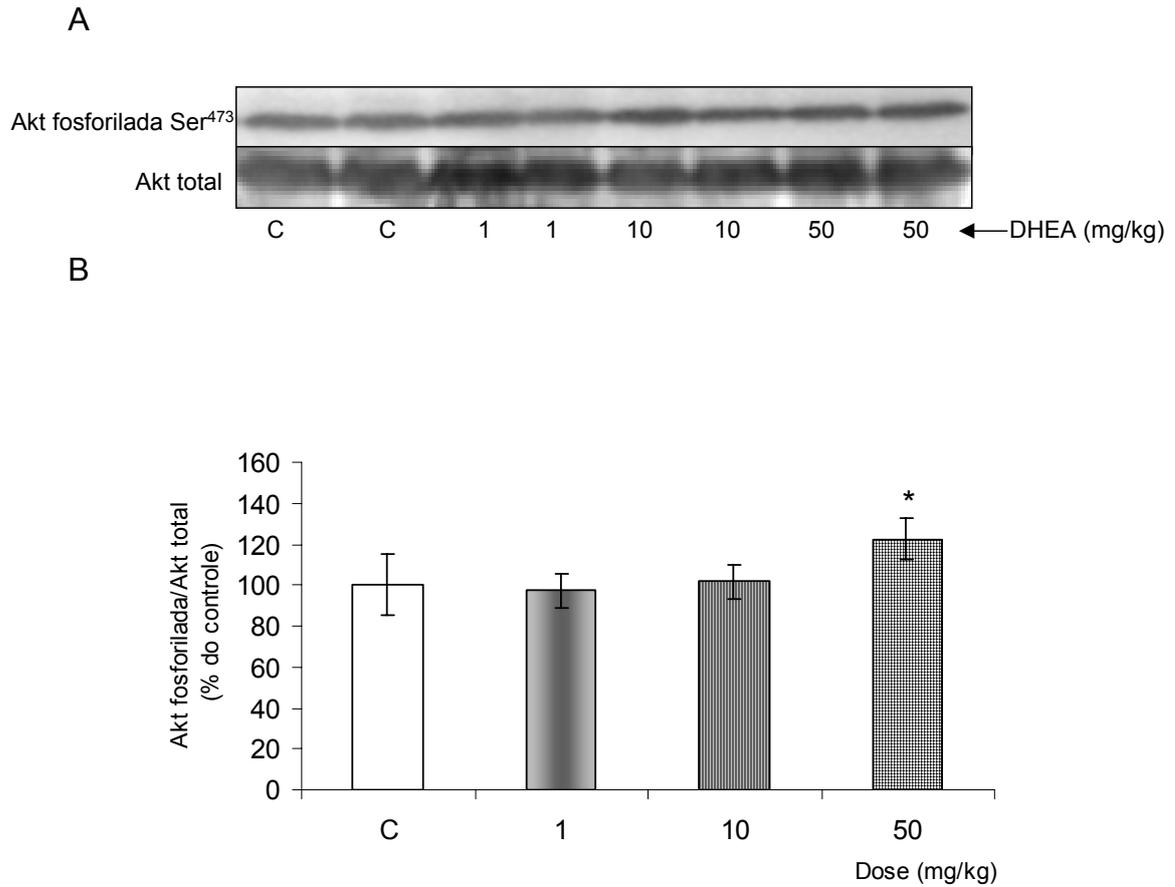
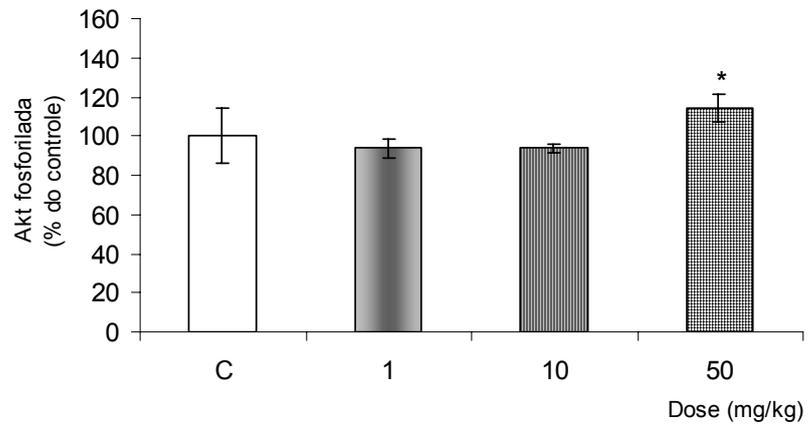


Figura 9: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1= 1 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle e às demais doses. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newman Keuls

A



B

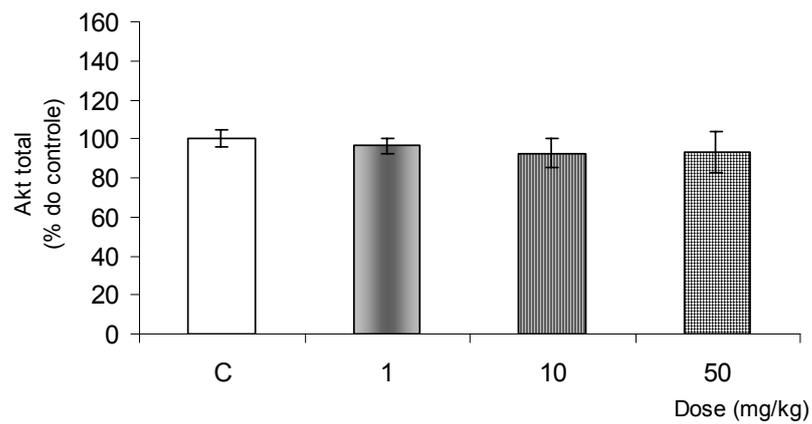


Figura 10: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após 24 horas de tratamento com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o controle 100%. C= controle (veículo); 1= 1 mg/kg; 10= 10 mg/kg; 50= 50 mg/kg. n=4. \* $P < 0,05$  em relação a todos os outros grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newman Keuls.

## 5.2. Grupos experimentais submetidos ao tratamento crônico:

### 5.2.1. Tratamento com DHEA em diferentes idades

#### 5.2.1.1. Hipocampo

##### 5.2.1.1.1. Experimento 1: comparação entre os grupos com 3 e com 13 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratados com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo de ratos com 13 meses administrados com o veículo foi significativamente menor em comparação com o grupo de 3 meses que também recebeu veículo. Além disso, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo de ratos com 13 meses tratados com DHEA foi menor em relação ao grupo da mesma idade tratado com o veículo. A expressão da Akt fosforilada também diminuiu no grupo 13 meses veículo comparando-se com o grupo controle 3 meses. A expressão da Akt fosforilada foi menor no hipocampo de ratos com 13 meses tratados com DHEA comparando-se com o grupo da mesma idade tratado com o veículo. Por outro lado, a expressão da Akt total aumentou no hipocampo do grupo 13 meses veículo comparando-se com o controle 3 meses. A expressão da Akt total aumentou no hipocampo de ratos com 13 meses de idade tratados com DHEA em relação ao grupo da mesma idade tratado com o veículo. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

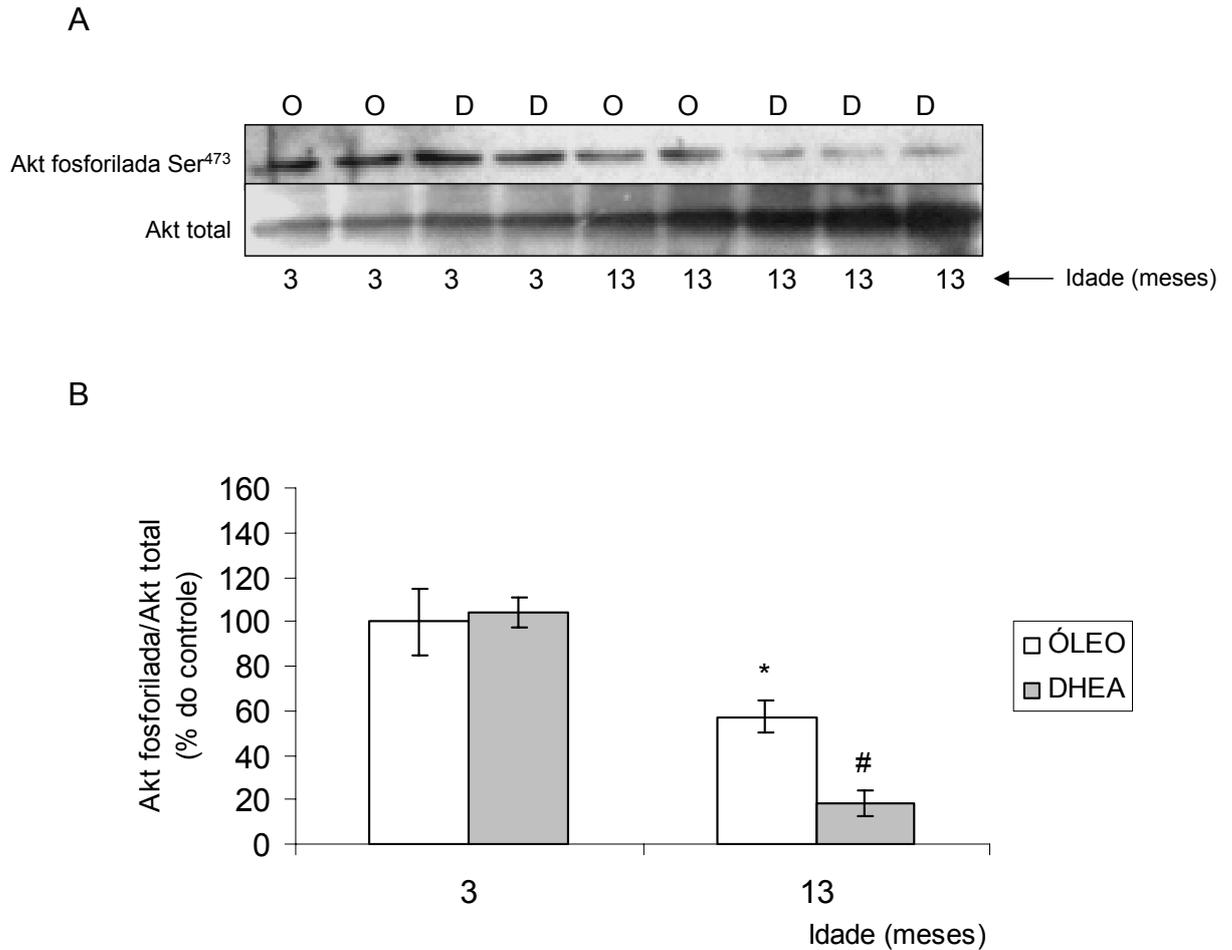


Figura 11: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo (veículo), D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%.  $n=4$  para os grupos 3 meses óleo e 3 meses DHEA;  $n=5$  para os grupos 13 meses óleo e 13 meses DHEA. \* $P<0,05$  em relação ao grupo controle; # $P<0,05$  comparando-se com o grupo 13 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newmann Keuls.

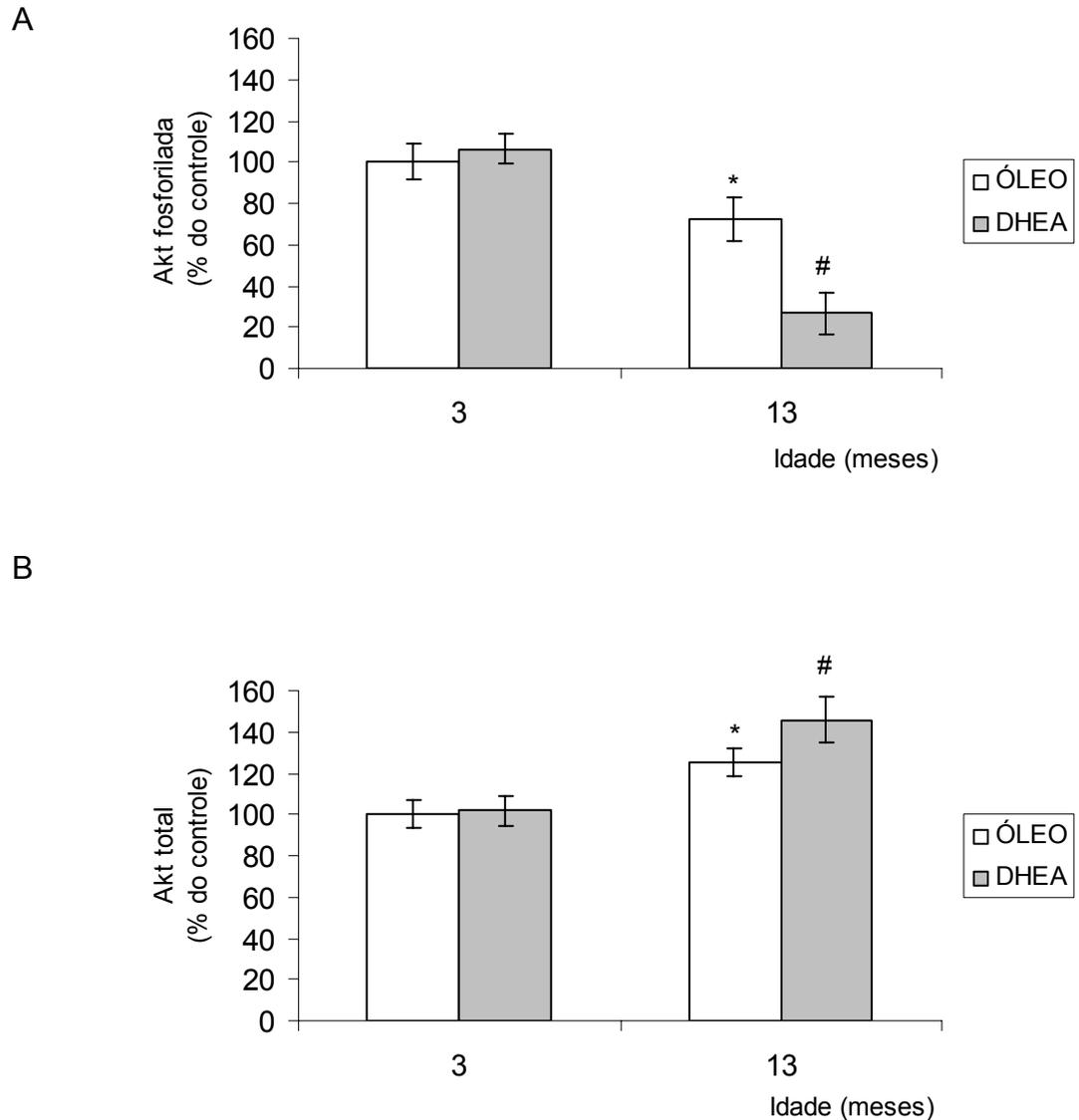


Figura 12: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%.  $n=4$  para os grupos 3 meses óleo e 3 meses DHEA;  $n=5$  para os grupos 13 meses óleo e 13 meses DHEA. \* $P<0,05$ , comparando-se com o grupo 3 meses óleo; # $P<0,05$ , comparando-se com o grupo 13 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

#### 5.2.1.1.2. Experimento 2: comparação entre os grupos com 3 e com 18 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratados com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo de ratos com 3 meses de idade administrados com DHEA foi significativamente menor em comparação com o grupo 3 meses de idade tratado com o veículo. A relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo do grupo com 18 meses administrados com veículo foi menor em relação ao grupo controle 3 meses. Além disso, a expressão da Akt fosforilada também diminuiu comparando-se o grupo 3 meses DHEA com o grupo controle. A expressão da Akt fosforilada foi menor no hipocampo do grupo 18 meses veículo comparando-se com o grupo controle 3 meses. Por outro lado, a expressão da Akt fosforilada no grupo com 18 meses tratado com DHEA aumentou em relação ao grupo com 18 meses tratado com veículo. A expressão da Akt total aumentou no hipocampo de ratos do grupo 18 meses tratados com DHEA comparando-se com o grupo da mesma idade que recebeu veículo. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

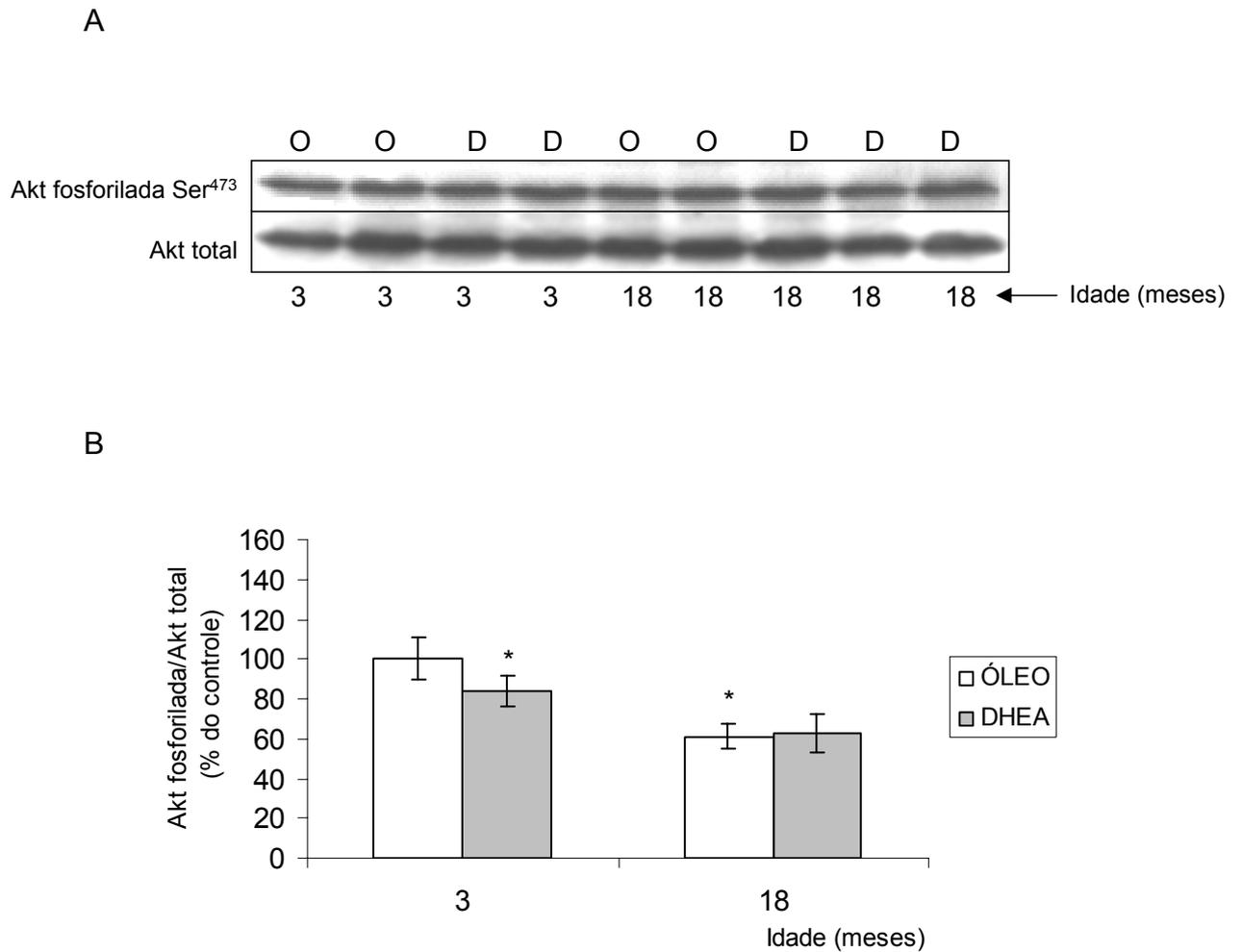


Figura 13: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo, D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo e 18 meses óleo; n=5 para os grupos 3 meses DHEA e 18 meses DHEA. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

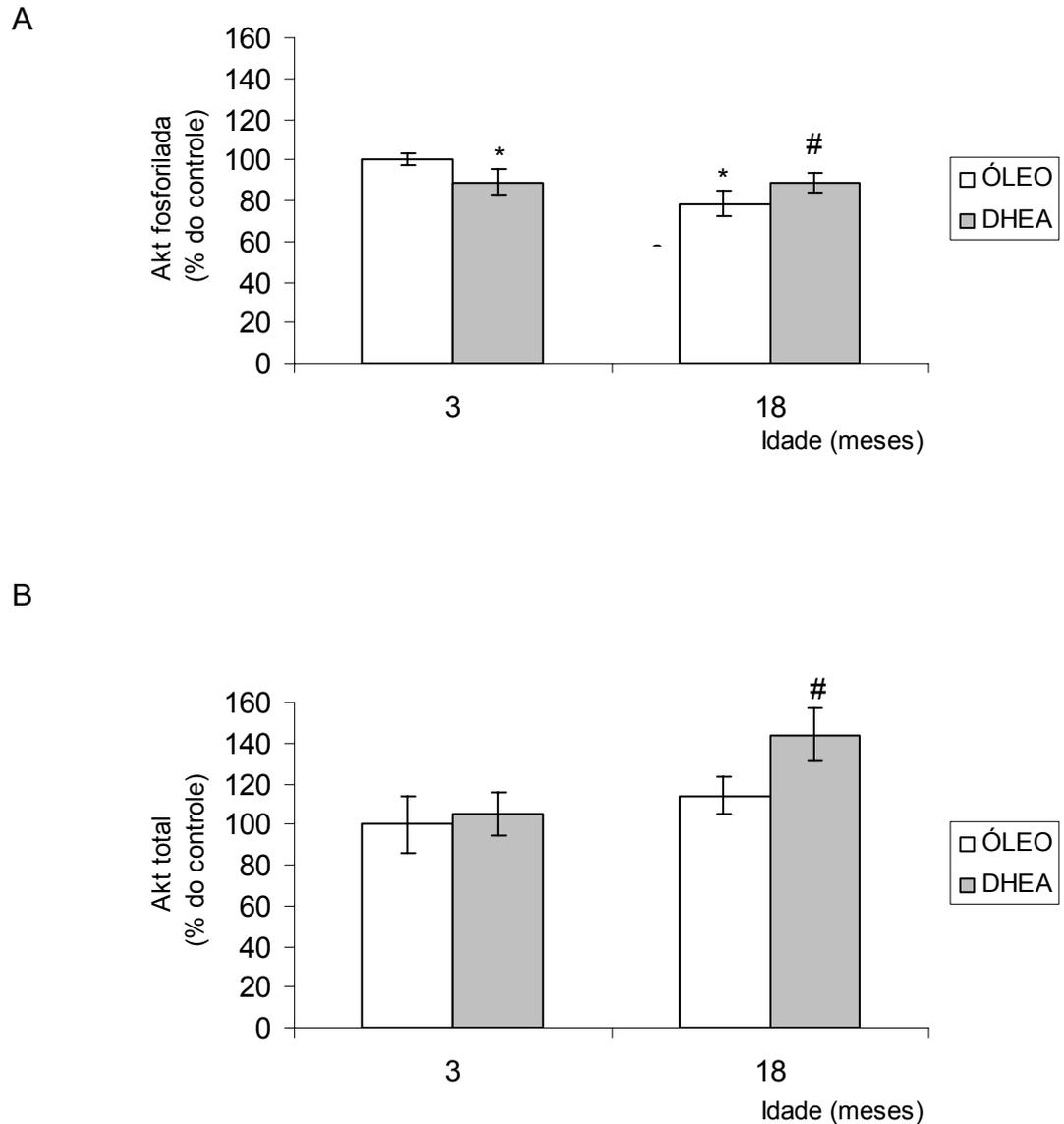


Figura 14: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%.  $n=4$  para os grupos 3 meses óleo e 18 meses óleo;  $n=5$  para os grupos 3 meses DHEA e 18 meses DHEA. \* $P<0,05$  comparando-se com o grupo 3 meses óleo; # $P<0,05$ , comparando-se com o grupo 18 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

#### 5.2.1.1.3. Experimento 3: comparação entre os grupos com 3 e com 21 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratado com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total hipocampo de ratos com 3 e com 21 meses de idade não foi modificada com o tratamento crônico com DHEA nem com o veículo. A expressão da Akt fosforilada diminuiu no hipocampo do grupo 21 meses veículo comparando-se com o grupo controle 3 meses. A expressão da Akt fosforilada foi maior no hipocampo do grupo com 21 meses de idade tratados com DHEA comparando-se com o grupo 21 meses veículo. A expressão da Akt total no hipocampo do grupo 21 meses veículo diminuiu comparando-se com o grupo controle 3 meses. Por outro lado, a expressão da Akt total aumentou no grupo 21 meses tratados com DHEA comparando-se com o grupo da mesma idade tratado com veículo. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

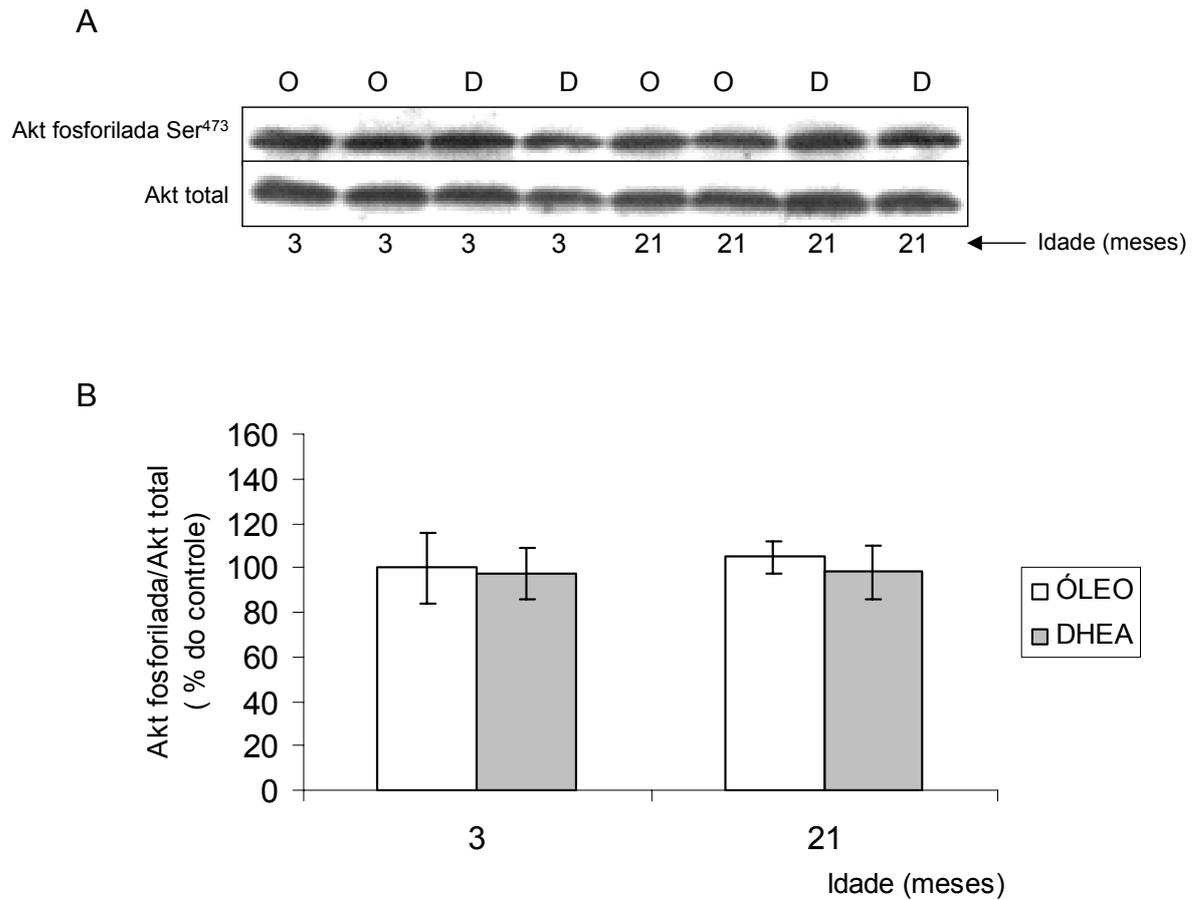
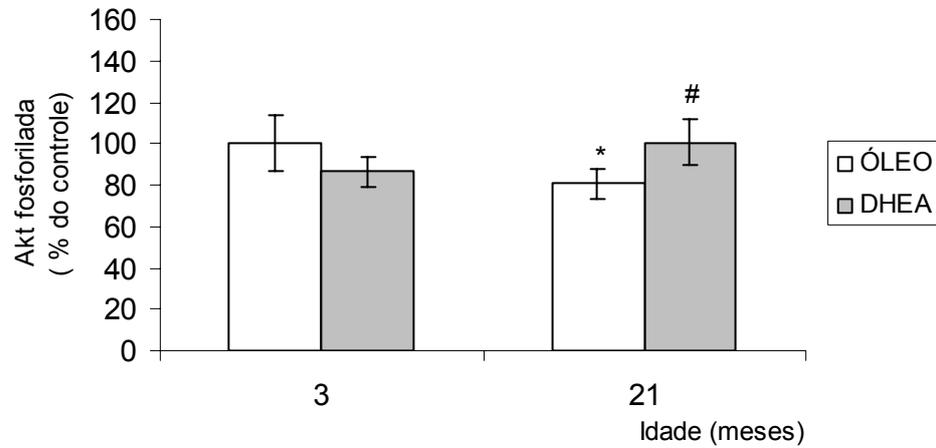


Figura 15: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo, D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo, 3 meses DHEA e 21 meses DHEA; n=3 para o grupo 21 meses óleo. ANOVA de duas vias.

A



B

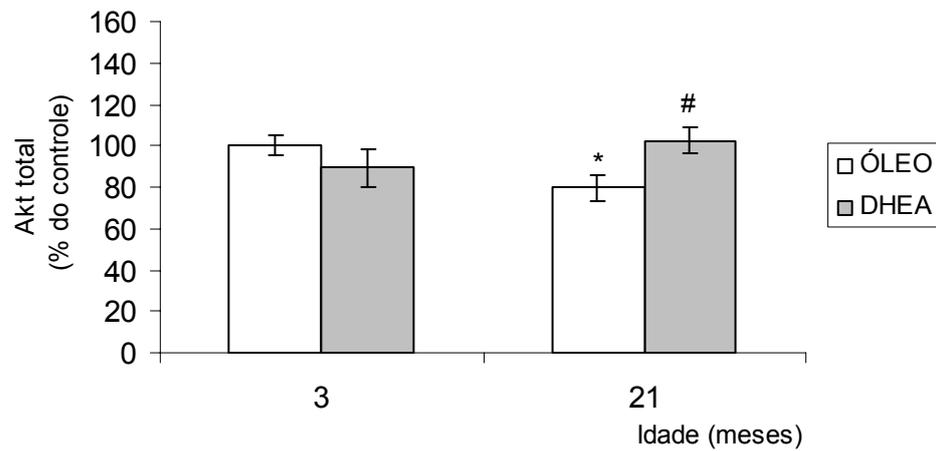


Figura 16: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%.  $n=4$  para os grupos 3 meses óleo, 3 meses DHEA e 21 meses DHEA;  $n=3$  para o grupo 21 meses óleo. \* $P<0,05$  comparando-se com o grupo 3 meses óleo; # $P<0,05$  comparando-se com o grupo 21 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

### 5.2.1.2. Hipotálamo

#### 5.2.1.2.1. Experimento 1: comparação entre os grupos com 3 e com 13 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratado com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo de ratos com 13 meses de idade administrados com o veículo foi significativamente menor em comparação com o grupo controle 3 meses. Além disso, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo de ratos com 13 meses tratados com DHEA foi menor em relação ao grupo 13 meses que recebeu veículo. A expressão da Akt fosforilada também diminuiu no hipotálamo do grupo 13 meses tratados com DHEA comparando-se com o grupo 13 meses tratados com veículo. Por outro lado, a expressão da Akt total não foi modificada em ratos com 3 e com 13 meses de idade tanto com o tratamento crônico com DHEA como também com o veículo. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 17 e 18.

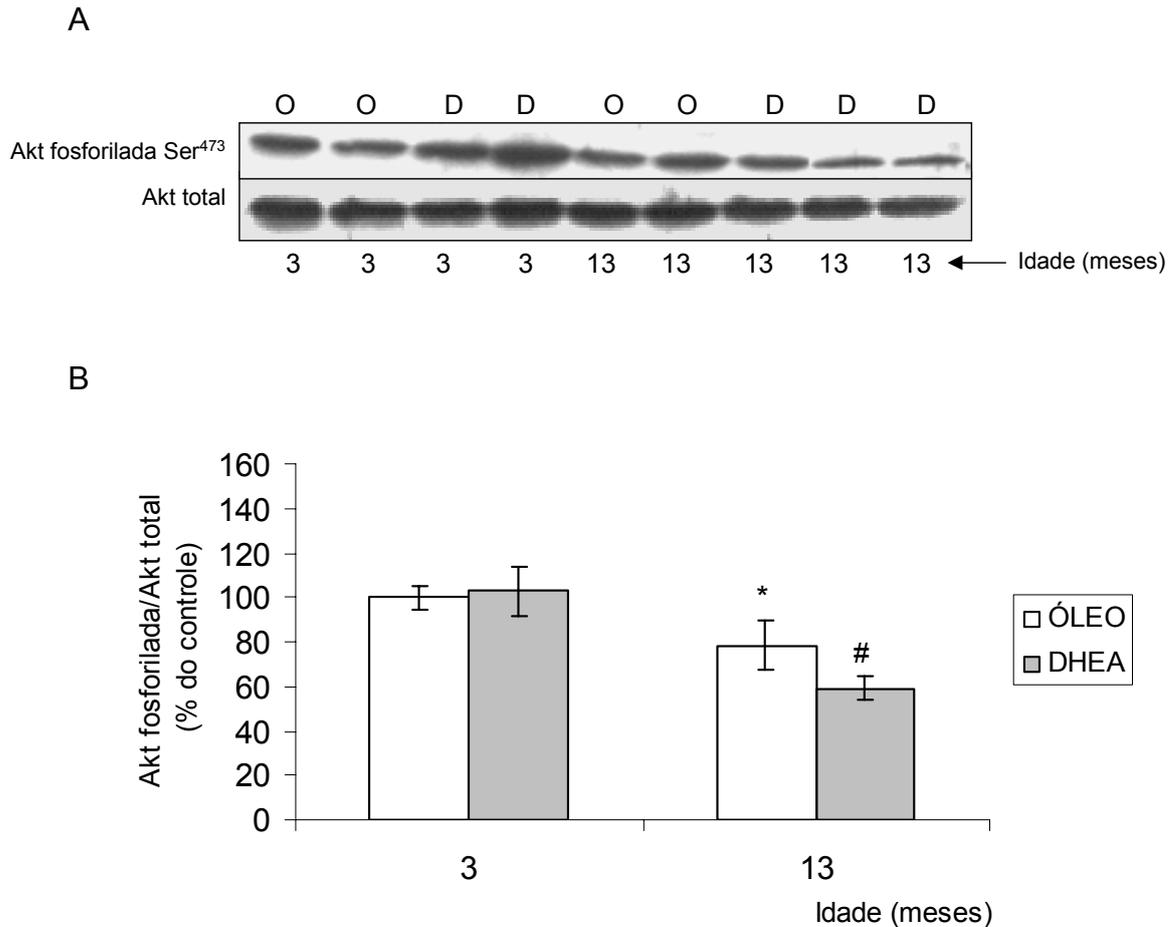
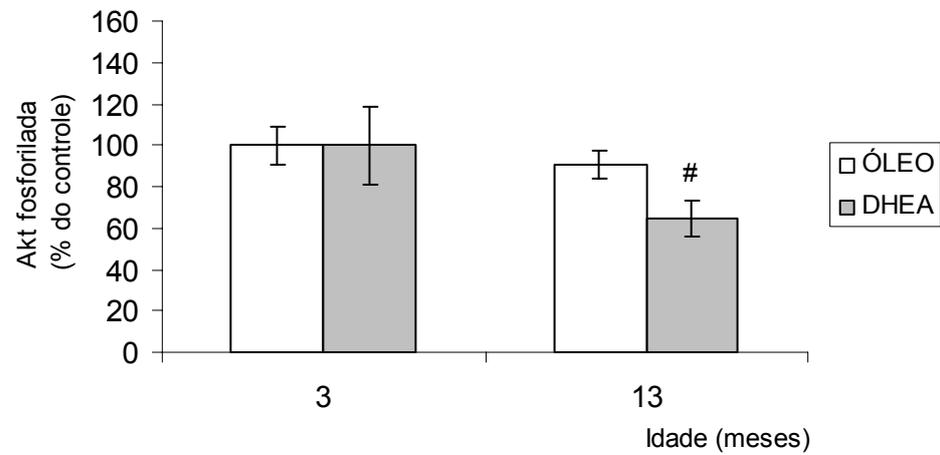


Figura 17: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo, D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo e 3 meses DHEA; n=5 para os grupos 13 meses óleo e 13 meses DHEA. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo 3 meses de idade óleo; # $P < 0,05$  comparando-se com o grupo 13 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

A



B

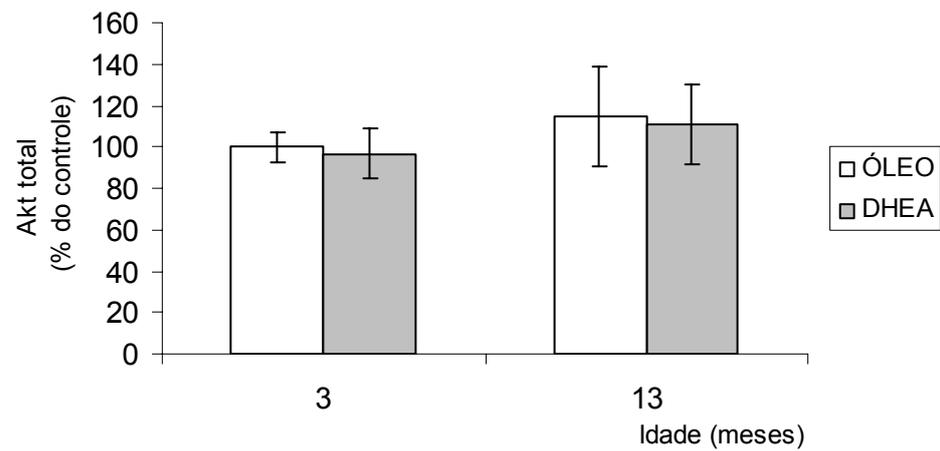


Figura 18: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 13 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%.  $n=4$  para os grupos 3 meses óleo e 3 meses DHEA;  $n=5$  para os grupos 13 meses óleo e 13 meses DHEA. <sup>#</sup> $P<0,05$  comparando-se com o grupo 13 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

#### 5.2.1.2.2. Experimento 2: comparação entre os grupos com 3 e com 18 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratado com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total, a expressão da Akt fosforilada e da Akt total no hipotálamo de ratos com 3 e com 18 meses de idade não foram modificadas com a administração crônica com DHEA, assim como não houve diferença com relação à idade do animal. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

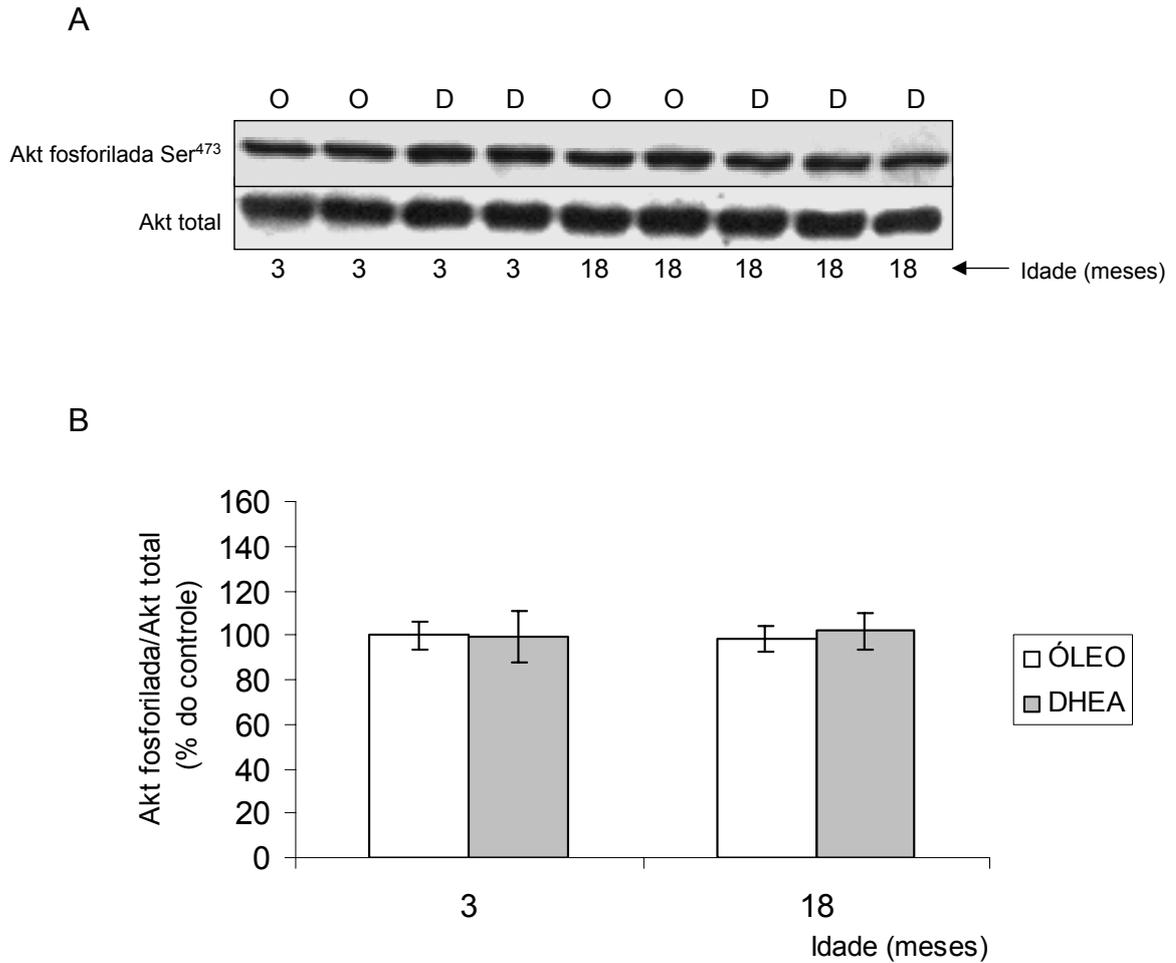
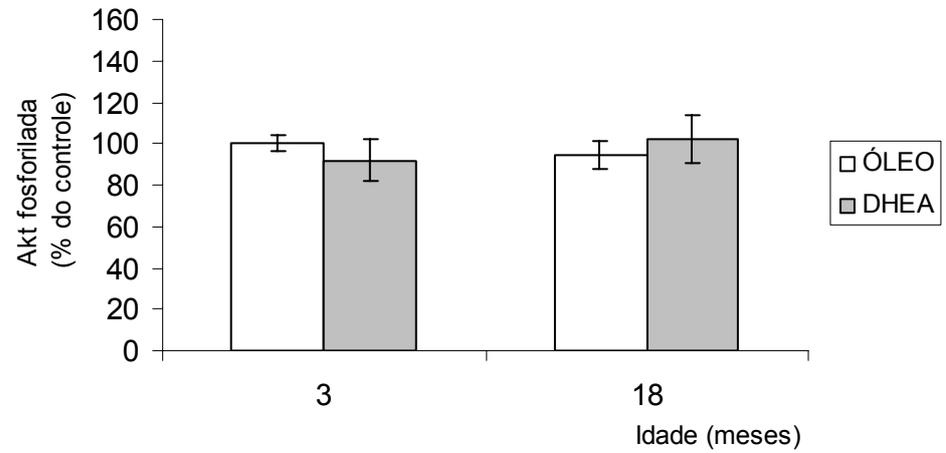


Figura 19: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo, D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo e 18 meses óleo; n=5 para os grupos 3 meses DHEA e 18 meses DHEA. ANOVA de duas vias.

A



B

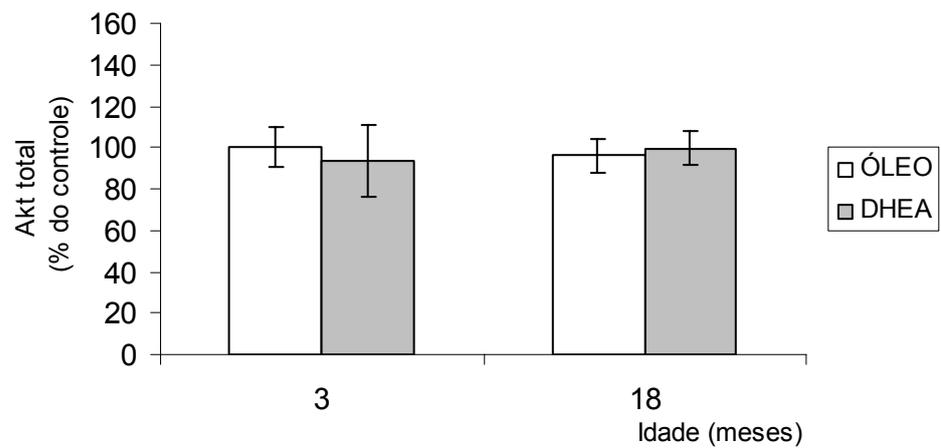


Figura 20: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 18 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo e 18 meses óleo; n=5 para os grupos 3 meses DHEA e 18 meses DHEA. ANOVA de duas vias.

### 5.2.1.2.3 Experimento 3: comparação entre os grupos com 3 e com 21 meses de idade

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos com 3 meses de idade tratados com veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo de ratos com 21 meses administrados com óleo foi menor comparando-se com o grupo controle 3 meses. Porém, não houve diferença significativa tanto na expressão da Akt fosforilada como da Akt total no hipotálamo após administração crônica com DHEA e com veículo nas diferentes idades. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 21 e 22.

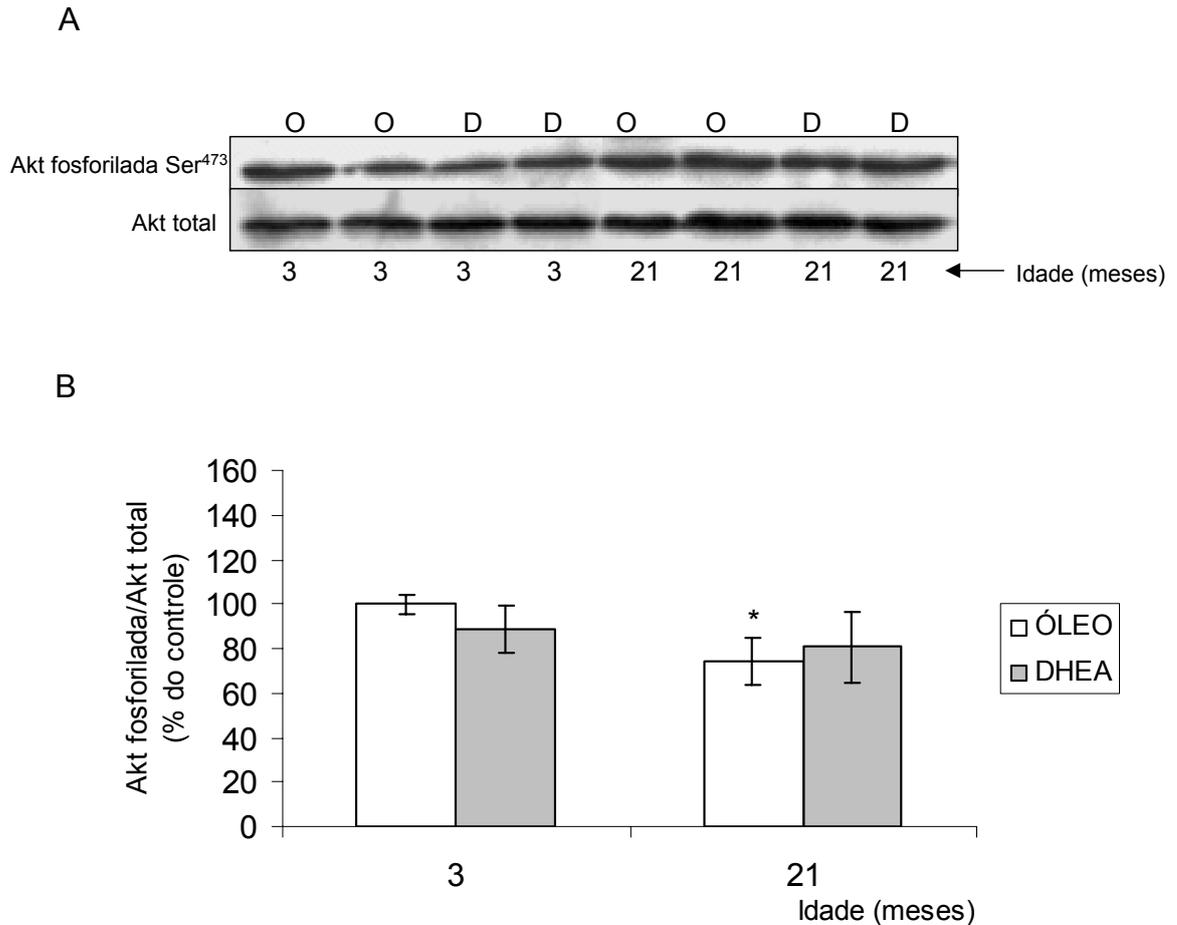
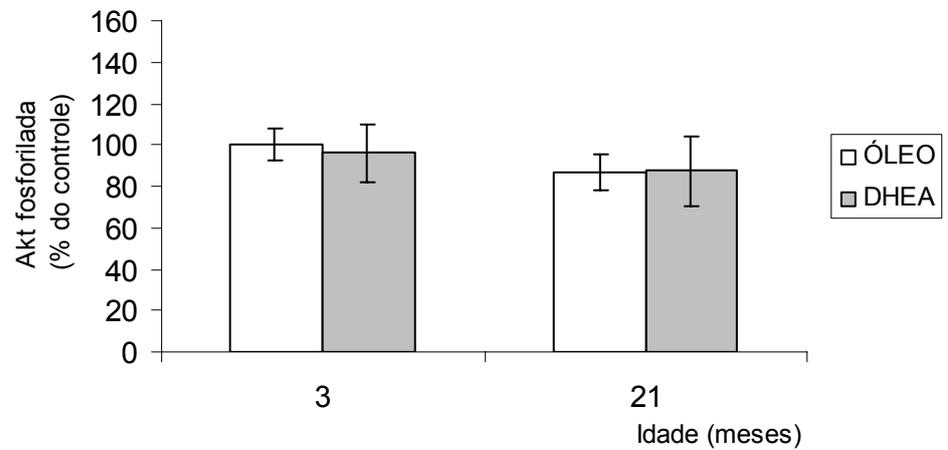


Figura 21: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. O= óleo, D= DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo, 3 meses DHEA e 21 meses DHEA; n=3 para o grupo 21 meses óleo. \* $P < 0,05$  comparando-se com o grupo 3 meses óleo. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newman Keuls.

A



B

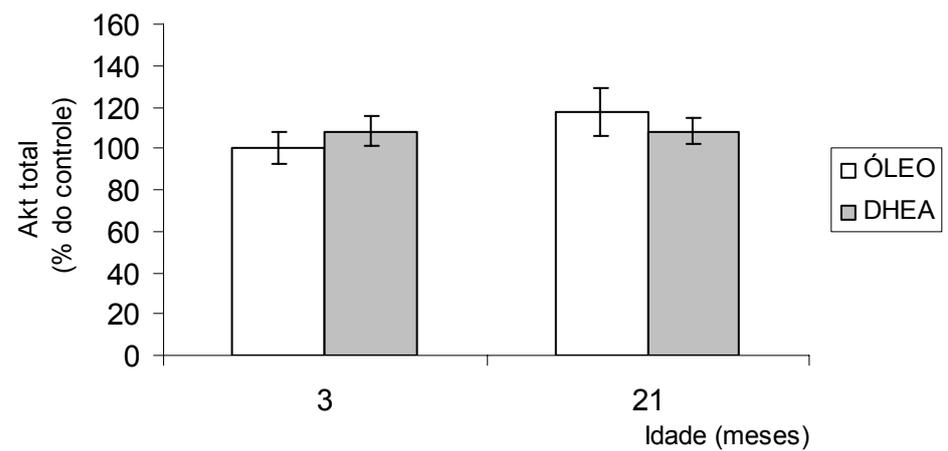


Figura 22: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo após tratamento crônico com DHEA em ratos com 3 e com 21 meses de idade. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de 3 meses óleo como controle 100%. n=4 para os grupos 3 meses óleo, 3 meses DHEA e 21 meses DHEA; n=3 para o grupo 21 meses óleo. ANOVA de duas vias.

## 5.2.2. Tratamento com DHEA em ratos diabéticos

### 5.2.2.1. Glicemia

Na primeira coleta, ou seja, no quarto dia após a indução da diabetes com estreptozotocina, porém antes do início do tratamento, a glicemia foi maior nos grupos que receberam a droga comparando-se com os grupos controle (não-diabéticos). Os valores de glicemia nestes animais estavam acima de 250 mg/dL, e portanto foram considerados diabéticos conforme Packer e colaboradores, 2000. Na segunda coleta, ou seja, no final do protocolo experimental com tratamento crônico, a glicemia manteve-se elevada nos grupos diabéticos tratados tanto com óleo como com DHEA comparando-se com os grupos controle tratados com óleo ou com DHEA. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Glicemia na primeira coleta de sangue. Glicemia no quarto dia após a injeção com estreptozotocina. Teste *t* de Student. n=8 para os grupos controle e diabético.

Glicemia (mg/dL)	Controle	Diabético
1° coleta	137,386 ± 22,659	603,474 ± 86,653*

\**P* < 0,0001 comparando-se com o grupo controle

Tabela 2: Glicemia na segunda coleta de sangue. Glicemia no final do tratamento crônico (5 semanas) com óleo ou com DHEA. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student Newmann Keuls. n=4 para os grupos controles óleo e DHEA; n=3 para o grupo diabético óleo;n=5 para o grupo diabético DHEA.

Glicemia (mg/dL)	Controle óleo	Controle DHEA	Diabético óleo	Diabético DHEA
2° coleta	105,287±16,255	97,130±21,727	531,118±92,531*	537,100±62,151*

\**P*<0,05 comparando-se os grupos diabéticos com os grupos controles (não-diabéticos)

#### 5.2.2.2. Hipocampo

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos controle que receberam o veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo dos ratos diabéticos tratados com o veículo foi significativamente menor em relação aos animais controle também tratados com o veículo. A expressão da Akt fosforilada também foi menor nos ratos diabéticos comparando-se com os ratos controle, ambos tratados com veículo. Porém, não houve diferença significativa da expressão da Akt total em nenhum grupo. O tratamento com DHEA não provocou alteração significativa sobre a relação Akt fosforilada/Akt total e sobre a expressão das proteínas Akt fosforilada e da Akt total, tanto nos grupos controle, como também nos diabéticos. Os resultados estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

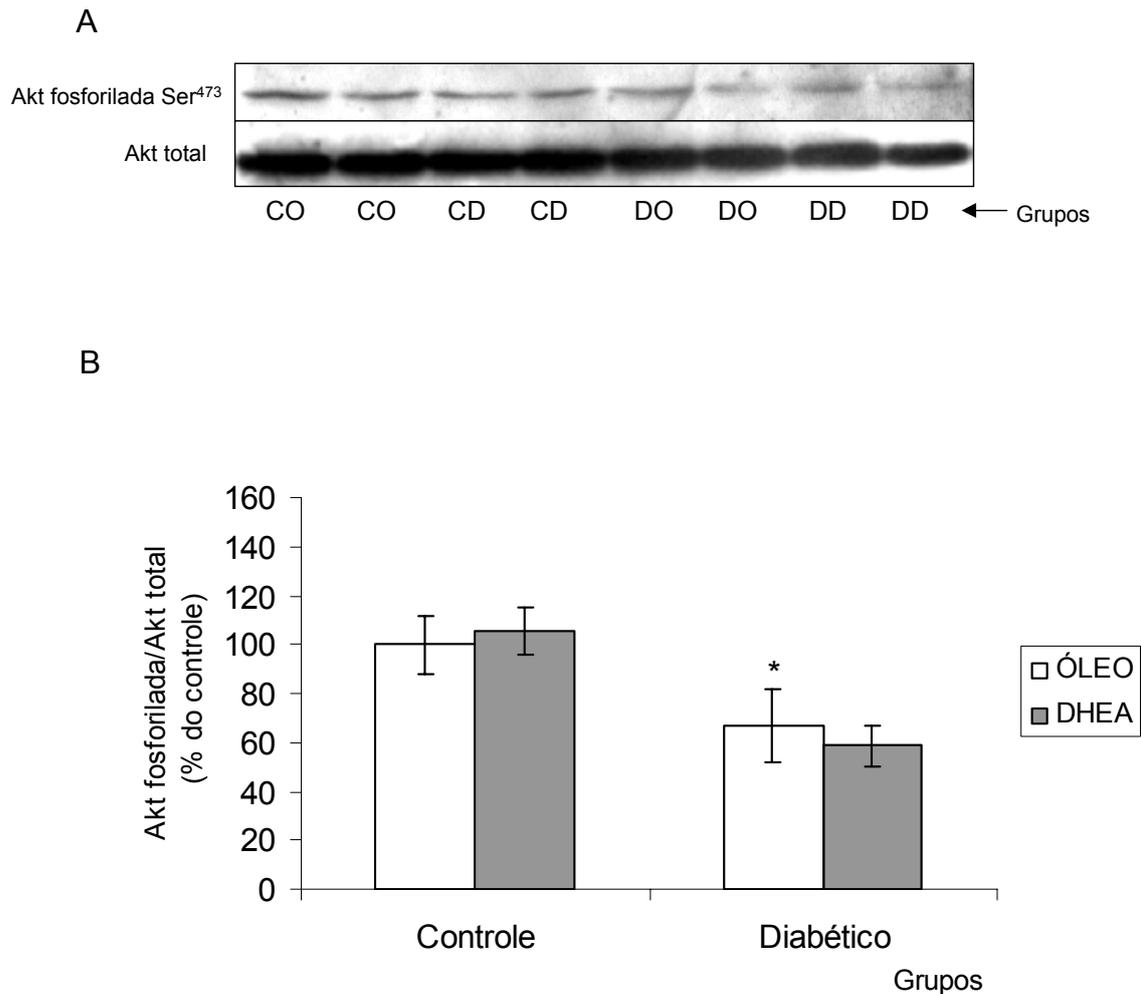
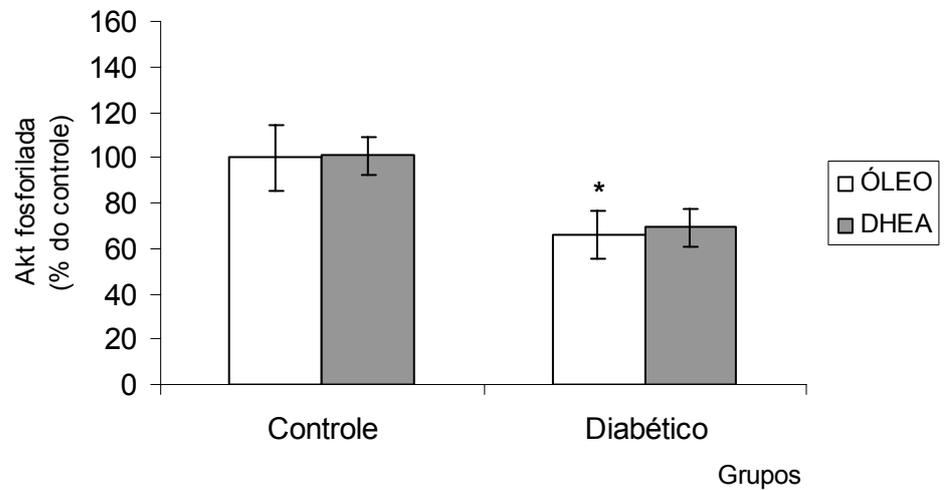


Figura 23: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. CO= controle óleo, CD=controle DHEA, DO=diabético óleo, DD= diabético DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo controle óleo como 100%. n=4 para o grupo controle óleo e DHEA, n=3 para o grupo diabético óleo, n=5 para o grupo diabético DHEA. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle óleo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student Newman Keuls.

A



B

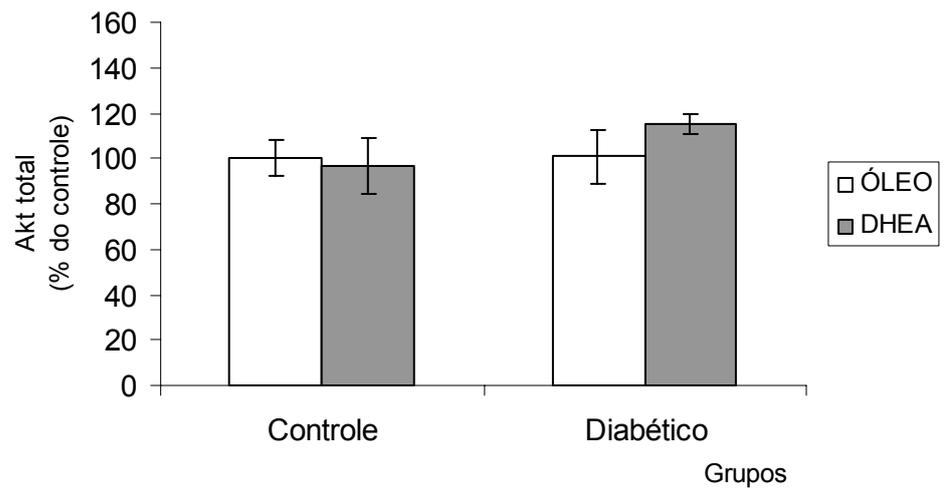


Figura 24: Akt fosforilada e Akt total no hipocampo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo de controle óleo como 100%.  $n=4$  para o grupo controle óleo e DHEA,  $n=3$  para o grupo diabético óleo,  $n=5$  para o grupo diabético DHEA.  $*P < 0,05$  em relação ao controle 3 óleo. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Student Newman Keuls.

### 5.2.2.3. Hipotálamo

Considerando-se a média dos valores do grupo de ratos controle que receberam o veículo (óleo) como controle 100%, a relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo dos ratos diabéticos tratados com veículo foi significativamente menor em relação aos animais controle (não-diabéticos) tratados com o veículo. A relação Akt fosforilada/Akt total aumentou no grupo diabético tratado com DHEA em relação ao grupo diabético tratado com veículo. A expressão da Akt fosforilada diminuiu nos ratos diabéticos óleo, comparando-se com os controles óleo, mas aumentou no grupo diabético tratado com DHEA. Porém, não houve diferença significativa da expressão da Akt total em nenhum grupo estudado. Os resultados estão apresentados nas Figuras 25 e 26.

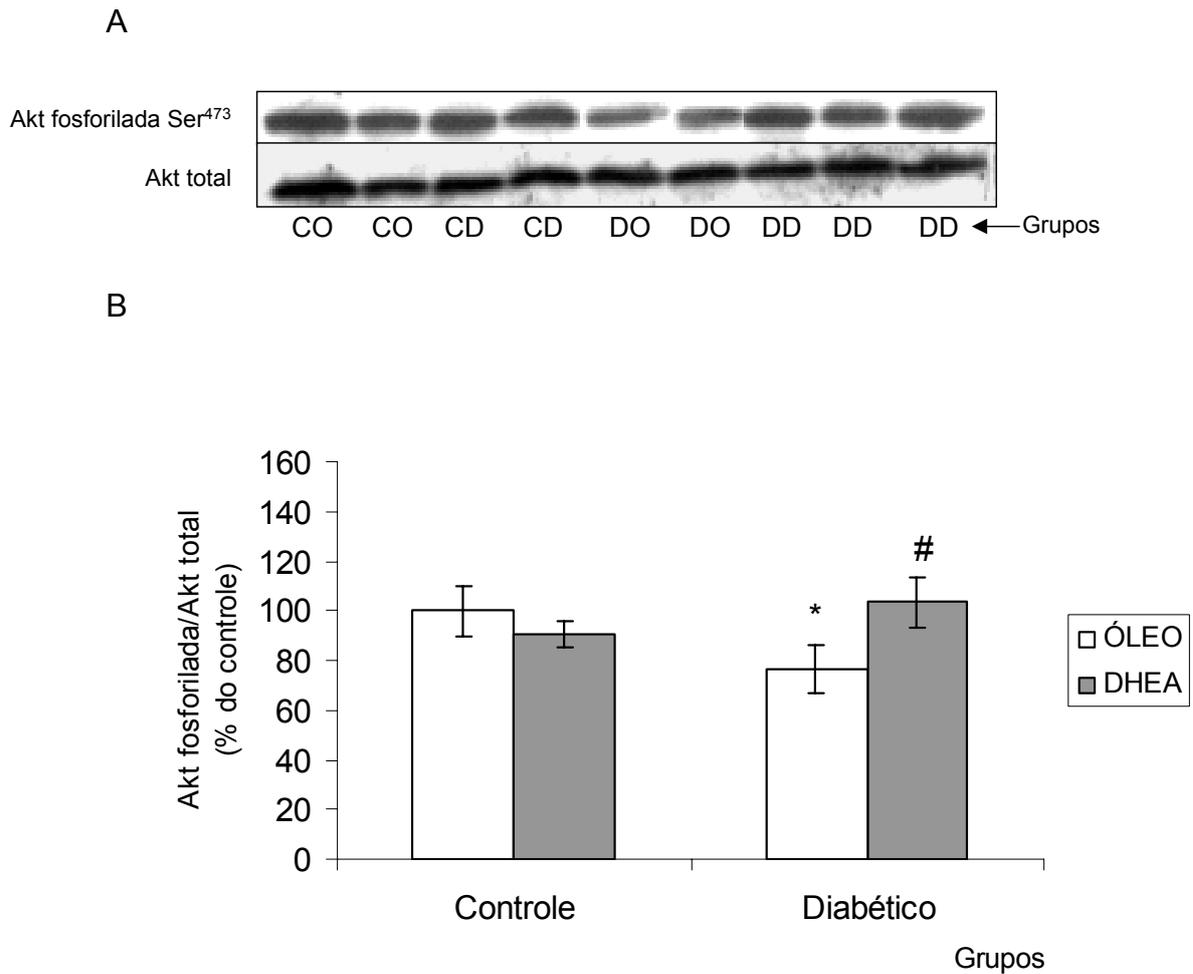
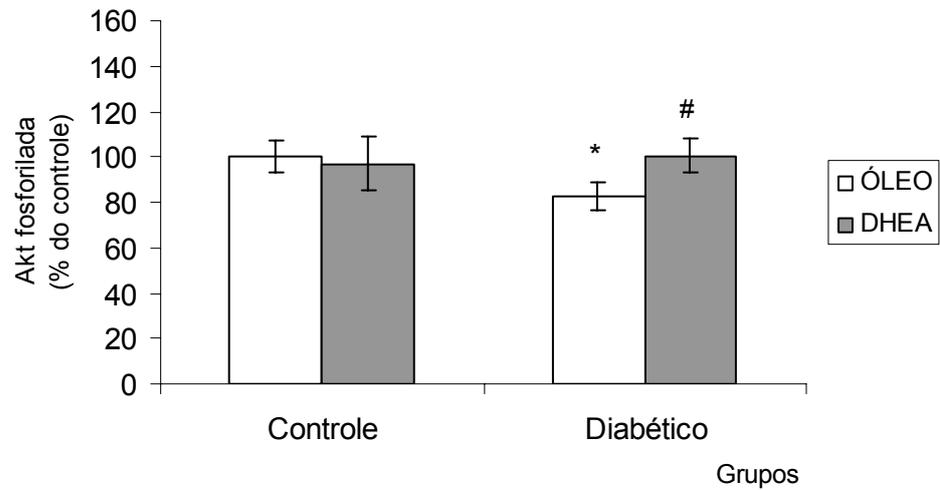


Figura 25: Expressão da relação Akt fosforilada/Akt total no hipotálamo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA. A) Bandas representativas das proteínas Akt fosforilada e Akt total. CO= controle óleo, CD=controle DHEA, DO=diabético óleo, DD= diabético DHEA. B) Relação Akt fosforilada/Akt total com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo controle óleo como 100%. n=4 para o grupo controle óleo e DHEA, n=3 para o grupo diabético óleo, n=5 para o grupo diabético DHEA. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle óleo. # $P < 0,05$  em relação ao grupo diabético óleo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student Newman Keuls.

A



B

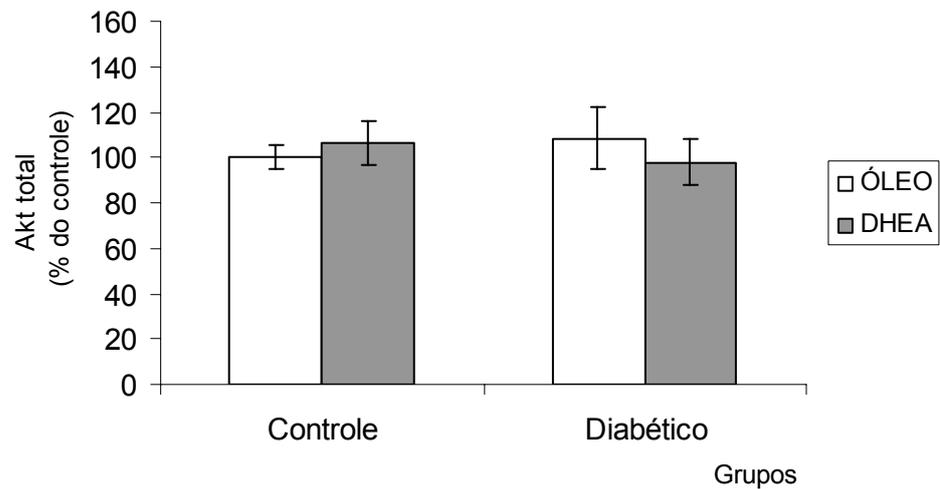


Figura 26: Akt fosforilada e Akt total no hipotálamo de ratos controle e diabéticos tratados com DHEA. A) Akt fosforilada. B) Akt total. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias considerando-se o grupo controle óleo como 100%.  $n=4$  para o grupo controle óleo e DHEA,  $n=3$  para o grupo diabético óleo,  $n=5$  para o grupo diabético DHEA. \* $P<0,05$  em relação ao controle óleo; #  $P<0,05$  em relação ao diabético óleo. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Student Newmann Keuls.

## 6. DISCUSSÃO

Em estudos prévios do laboratório, a expressão do receptor de IGF-I diminuiu no hipotálamo de ratos machos adultos após 24 horas de tratamento com DHEA (50mg/kg). Entretanto, a concentração de IGF-I encontrada, nesta mesma estrutura, foi maior comparando-se com o grupo tratado com veículo (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002). O efeito da diminuição do receptor do IGF-I foi específico para o hipotálamo, tendo em vista que em outras estruturas do SNC estudadas (hipocampo, córtex cerebral e cerebelo) não houve alteração da sua expressão. Os efeitos da DHEA no sistema IGF-I hipotalâmico podem ser relevantes para o controle e a manutenção das funções neuroendócrinas do hipotálamo (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002). Dessa forma, partindo-se do pressuposto de que a DHEA exerce efeitos modulatórios tanto na expressão do receptor de IGF-I como também nos níveis de IGF-I no SNC, e considerando-se que o IGF-I é um fator neurotrófico que exerce efeitos neuroprotetores *in vitro* e *in vivo*, e que, por sua vez, tais efeitos estão relacionados com a ativação da via de sinalização intracelular PI3-K/Akt (CHENG *et al*, 2003, D' ERCOLE *et al*, 1996; ZHENG *et al*, 2000, 2002; VAN GOLEN & FELDMAN, 2000; BRYWE *et al*, 2005, HECK *et al*, 1999; FELDMAN *et al*, 1997), estabeleceu-se a hipótese de que a DHEA poderia modular a via da Akt no SNC.

O objetivo do presente estudo foi investigar se o tratamento com DHEA interfere na expressão da Akt no SNC de ratos submetidos a diferentes protocolos experimentais. Nos resultados encontrados, de uma forma geral, a administração aguda e crônica de DHEA modula a Akt, dependendo do esquema de tratamento utilizado, da idade e da característica fisiopatológica do animal, assim como da estrutura analisada.

O hipocampo é um componente neural fundamental para as atividades cognitivas. Lesões nesta estrutura interferem na codificação, armazenamento e recuperação da memória, assim como no aprendizado, tanto em humanos como em animais experimentais (SQUIRE & KANDEL, 1999). O hipotálamo é um importante centro de integração de respostas a estímulos ambientais e internos, sendo responsável pelo controle de vários mecanismos homeostáticos. Esta estrutura recebe informações de diversas regiões do SNC, como do córtex cerebral e do

sistema límbico, regulando diversas funções importantes como as funções viscerais simpáticas e parassimpáticas, os comportamentos, tais como a ingestão alimentar e o comportamento sexual, e funções endócrinas, produzindo e secretando hormônios hipofisiotróficos que estimulam ou inibem a liberação de outros hormônios da hipófise. Devido à importância do hipocampo e do hipotálamo, aos resultados anteriores, e às alterações morfológicas e funcionais presentes nestas estruturas no envelhecimento e na diabetes, estas duas estruturas do SNC foram escolhidas para investigar se o tratamento com DHEA poderia modular a via da Akt. Esta via está relacionada com a promoção da sobrevivência, contribuindo para o esclarecimento de um possível mecanismo de sinalização intracelular modulada por este hormônio, o que justificaria o seu papel neuroprotetor em diversos modelos experimentais de injúria ao SNC.

Realizando-se uma curva de dose com diferentes períodos de tratamento em animais adultos, observou-se que o tratamento com DHEA aumentou a fosforilação da Akt tanto no hipocampo como no hipotálamo. Todavia, tal fato ocorreu apenas na maior dose testada (50mg/kg) e foi diferente em cada estrutura com relação ao período de tratamento. Realizando-se o tratamento crônico com DHEA em ratos com diferentes idades (3, 13, 18 e 21 meses) e diabéticos, os resultados encontrados também foram diferentes com relação ao efeito do tratamento nas estruturas analisadas. Além disso, com relação ao efeito do envelhecimento sobre a via da Akt, os resultados foram distintos entre as idades, assim como entre as estruturas. É natural que o hipotálamo e o hipocampo apresentem respostas diferentes, pois são estruturas com funções e regulação completamente independentes. Todavia, em animais diabéticos, houve alteração da via da Akt pela doença comparando-se com animais não diabéticos em ambas as estruturas analisadas.

Optamos por discutir inicialmente a modulação da expressão desta proteína em duas situações nas quais o SNC é submetido a maior dano, nas quais a DHEA poderia ter efeito terapêutico benéfico atuando como neuroprotetor. Estas situações são o envelhecimento (estado fisiológico) e a diabetes (patológico). Durante o envelhecimento diversas modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais ocorrem no SNC. Entre as alterações morfológicas há a perda neuronal no neocórtex e no hipocampo e a deterioração dos circuitos sinápticos (MORRISON &

HOLF, 1997; DRISCOLL & SUTHERLAND, 2005). Na diabetes, o aumento do estresse oxidativo devido à hiperglicemia crônica induz dano a diversas estruturas do sistema nervoso central, tais como o hipocampo, o córtex e o cerebelo (ARAGNO *et al*, 1999, 2000, 2002; ATEES *et al*, 2007; BIESELS *et al*, 2002; LI *et al*, 2002). Além disso, há uma diminuição de neurônios e degeneração neurítica do córtex frontal (LI *et al*, 2007) e apoptose dos neurônios hipotalâmicos e diminuição da densidade neuronal do núcleo supraóptico hipotalâmico (KIMONIDES *et al*, 2004; KLEIN *et al*, 2004). Estas alterações no SNC que ocorrem no envelhecimento e na diabetes podem ser tanto devidas à diminuição de sinais extrínsecos, tais como fatores de crescimento e hormônios, como devido à reduzida responsividade das células para a sinalização adequada e à alteração da expressão e/ou atividade de receptores e moléculas envolvidas nos mecanismos de sinalização intracelular (KLEMPIN & KEMPERMANN, 2007; SONNTAG *et al*, 1999; TAN & BAXTER, 1986; ISHII *et al*, 1994; WUARIN *et al*, 1994; SONG *et al*, 2007; LI *et al*, 2007).

Os resultados referentes ao efeito do envelhecimento sobre a expressão de Akt, nos quais os animais receberam apenas o veículo, foram bastante interessantes. No hipocampo de animais com 13 e com 18 meses de idade tratados com veículo, houve uma diminuição da relação Akt fosforilada/Akt total em relação ao seu correspondente grupo controle (42,9% e 38,8%, respectivamente). Porém, no grupo com 21 meses tratados com veículo, não houve diferença com relação à idade comparando-se com o seu respectivo grupo controle de 3 meses. A diminuição da relação tanto no grupo com 13 meses, como no grupo com 18 meses é decorrente de uma diminuição da expressão da Akt fosforilada (27,8% e 21,7%, respectivamente). Além disso, nos animais com 13 meses de idade, houve também um aumento da Akt total de 25% em relação ao seu grupo controle, o que incrementa a redução da relação entre o estado fosforilado e total neste grupo. Nos animais com 18 meses, não houve alteração da expressão da Akt total. Embora não tenha sido encontrada diferença na relação entre Akt fosforilada e Akt total, nos animais com 21 meses comparando-se com o seu grupo controle adulto, a análise da expressão destas proteínas, separadamente, mostrou uma redução de 19,1% e de 20,3%, na expressão tanto da Akt fosforilada como da Akt total, o que justificaria a ausência de modificação da relação. A partir desses dados, pode-se concluir que a

modulação da fosforilação da Akt e da síntese da Akt total ocorre por mecanismos independentes, podendo inclusive serem reguladas em direções inversas, isto é, ocorrendo aumento da expressão da proteína total ao mesmo tempo que está ocorrendo diminuição da fosforilação. É provável que muitos outros fatores interfiram, tais como o estresse oxidativo, o qual aumenta dependendo da idade do animal nestas estruturas (SIQUEIRA *et al*, 2005 a, b). Além disso, mudanças do estado redox celular no envelhecimento também podem interferir na modulação de vias intracelulares podendo levar à morte ou à sobrevivência celular de acordo com os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (YOON *et al*, 2002). Concentrações baixas de ERO, particularmente do peróxido de hidrogênio, induzem atividade mitogênica e proliferativa, enquanto que o estresse oxidativo severo pode causar a morte celular tanto por necrose como por apoptose por ativar ou por inibir vias pró ou antiapoptóticas (MARTINDALE & HOLBROOK, 2002). Sendo assim, diante dos resultados encontrados no hipocampo com relação ao efeito do envelhecimento na via da Akt, sugere-se que nas idades de 13 e 18 meses a ativação enzimática estaria diminuída. O fato da Akt total aumentar apenas aos 13 meses de idade poderia ser devido à necessidade de disponibilização de substrato para a ativação da Akt, para lidar com a ruptura homeostática enfrentada devido a modificações celulares e moleculares que ocorrem com o avançar da idade. Esta é uma idade considerada intermediária em relação às demais, e respostas satisfatórias diante desses desafios ainda estariam presentes, como o aumento da Akt total, para manter a sobrevivência celular. Entretanto, nos 18 meses não há modificação da expressão Akt total e, nos animais com 21 meses ocorre uma diminuição. Em suma, parece que à medida que a idade avança a capacidade de aumentar a síntese de Akt diminui. A queda da Akt total poderia então ser um fator para a diminuição da Akt fosforilada aos 21 meses. Estas diminuições poderiam justificar a perda neuronal no hipocampo de ratos com idade avançada. No hipocampo de ratos, foi detectado que há uma preservação do conteúdo neuronal até 22 meses de idade e uma significativa perda neuronal entre 22 e 24 meses de idade em ambos os sexos (AZCOITIA *et al*, 2005). Diversos estudos mostraram que há pouca ou nenhuma perda neuronal detectável com o envelhecimento em diferentes estruturas e entre diferentes espécies, indicando que a deficiência

funcional estaria mais associada com mudanças na sinaptogênese e na função neuronal do que com mudanças no número de neurônios propriamente dito (AZCOITIA *et al*, 2005; RAPP & GALLAGHER, 1996; WICKELGREN, 1996; MORRISON & HOLF, 1997; KEUKER *et al*, 2003; BOHLEN UND HALBACK & UNSICKER, 2002; KEMPLIN & KEMPERMANN, 2007).

Já no hipotálamo, houve redução da relação Akt fosforilada/Akt total comparando-se o grupo 13 meses (21,5%) e 21 meses (25,7%) com seus respectivos grupos controle. Tais reduções podem ser explicadas porque houve diminuição de 9,3% e 13,2% da Akt fosforilada nos grupos com 13 e 21 meses, respectivamente. Além disso, a Akt total aumentou 14,3% e 17,7%, respectivamente. Entretanto, esses dados referentes à expressão da Akt fosforilada e da Akt total não foram diferentes estatisticamente em relação aos seus respectivos grupos controle, mas justificam as mudanças encontradas na relação. Mesmo sem significância estatística, observa-se novamente que ocorre uma regulação no sentido inverso da Akt fosforilada e da Akt total. Estes resultados reforçam a importância de se analisar separadamente a expressão da Akt fosforilada, da Akt total, e da relação entre elas, tendo em vista que apenas a relação pode não evidenciar o que está ocorrendo de fato com a regulação desta proteína. Além disso, também pode haver mecanismos de regulação diferentes para a fosforilação e para a síntese da Akt. De fato, é bastante provável que isso ocorra, uma vez que a síntese proteica envolve um complexo sistema de regulação da transcrição gênica e, posteriormente, para a tradução, enquanto a fosforilação de uma proteína envolve outras cascatas de sinalização e enzimas não relacionadas, necessariamente, com a síntese proteica. Além disso, até mesmo as vias de sinalização podem interagir, levando a uma determinada resposta dependendo das enzimas e dos fatores transcricionais ativados ou inibidos.

A metodologia usada neste trabalho não permite a análise de diferentes núcleos hipotalâmicos, o que poderia apresentar resultados distintos, uma vez que o hipotálamo é uma estrutura bastante heterogênea, com importante papel multifuncional. Entre as funções hipotalâmicas, deve-se considerar seu papel na manutenção de funções endócrinas. Além disso, os animais utilizados neste estudo não eram castrados, e, portanto, seus níveis hormonais sistêmicos também

poderiam estar participando da regulação de vias intracelulares dos diferentes núcleos hipotalâmicos.

Nossos resultados estão de acordo com estudos que evidenciaram alterações na via da Akt com o envelhecimento. Ikeyama e colaboradores, 2002, utilizando cultura primária de hepatócitos de ratos com 4-6 meses e 24-26 meses, verificaram que os hepatócitos dos ratos velhos são mais sensíveis à apoptose induzida por peróxido de hidrogênio do que as células dos jovens. Esta baixa sobrevivência estava associada com a menor ativação da Akt. Em outro estudo, a regeneração pancreática após pancreatômia parcial foi menor quando se comparou camundongos jovens (4-6 meses) com velhos (23-24 meses) e esta redução foi relacionada com a menor ativação da via PI3K/Akt (WATANABE *et al*, 2005). Uma redução da sinalização PI3-K também foi encontrada no fígado, no coração e no músculo esquelético e havia uma correlação com a idade avançada (CARVALHO *et al*, 1996; MARTINEAU *et al*, 1999). Ratos com 14 meses de idade apresentaram dano no tecido renal e tal fato estava relacionado com a menor atividade da Akt quando comparados com ratos de 4 meses (PAREKH *et al*, 2004).

Conforme já discutido anteriormente, as modificações nas vias de sinalização que ocorrem no envelhecimento podem ser devidas à reduzida responsividade das células por modificações na expressão de moléculas receptoras de sinais extrínsecos, bem como pela redução funcional de sistemas hormonais, induzindo a redução de hormônios e de fatores de crescimento os quais podem modular cascatas de sinalização intracelulares. Um desses fatores de crescimento relacionado com a sobrevivência das células no SNC é o IGF-I. A análise da expressão protéica de IGF-I no córtex cerebral de ratos com 32 meses de idade mostra uma diminuição de 36,5% comparando-se com ratos de 11 meses (SONNTAG *et al*, 1999). O receptor de IGF-I também diminuiu no hipocampo e no córtex cerebral (SONNTAG *et al*, 1999). Em camundongos com 22 meses de idade, as células do núcleo supraóptico hipotalâmico apresentaram uma redução da imunorreatividade para os receptores de IGF-I comparando-se com animais de 6 semanas, porém, com a restrição calórica, tal redução foi amenizada (YAGHMAIE *et al*, 2006).

Receptores acoplados à proteína G também ativam a PI3-K, o que por sua vez, pode induzir a fosforilação da Akt (MURGA *et al*, 1998, WYMAN *et al*, 2003). Comparando-se animais de 3, 6, 20 e 24 meses de idade com ratos de 3 semanas, houve redução da expressão da proteína  $G\beta_4$  no córtex frontal, no estriado, no hipotálamo, no hipocampo, no cerebelo, no córtex cerebral, no tálamo, na medula e na amígdala. Além disso, a comparação de ratos de 6, 20 e 24 meses com os de 3 meses, essa redução não esteve presente apenas no hipotálamo e no hipocampo (SONG *et al*, 2007).

Diferentemente dos nossos resultados com relação ao aumento significativo do conteúdo da Akt total no hipocampo de animais com 13 meses e à diminuição em animais com 21 meses, Song e colaboradores, 2007, não encontraram modificações em nenhuma estrutura analisada para a expressão da Akt total. Por outro lado, para o hipotálamo, nossos achados referentes à expressão da Akt total estão de acordo com este estudo, ou seja, não foi modificada com o envelhecimento. Porém, um aumento de cerca de 2 vezes na fosforilação da Akt foi encontrado apenas no estriado de ratos de 20 e 24 meses comparando-se tanto com ratos de 3 semanas como com ratos de 3 meses (SONG *et al*, 2007). Neste mesmo estudo, não houve alteração na expressão da Akt fosforilada no hipotálamo e no córtex frontal. A ausência de modificação da expressão da Akt fosforilada no hipotálamo com o envelhecimento também foi evidenciado no nosso estudo. Ao contrário dos nossos achados referentes à redução da fosforilação da Akt, no hipocampo, foi encontrado aumento da fosforilação da Akt nos ratos com 20 e 24 meses em relação aos ratos de 3 meses (SONG *et al*, 2007). No córtex cerebral, a fosforilação da Akt aumentou nas idades de 3 e 6 meses em relação aos de 3 semanas, não modificando com o envelhecimento. Em suma, nesse estudo, o envelhecimento (considerado pela comparação entre animais com 3 e 24 meses) promoveu um significativo aumento da fosforilação da Akt no estriado, no hipocampo, no cerebelo e no tálamo e portanto, o encéfalo envelhecido seria mais vulnerável à neoplasia devido ao aumento da ativação da via, que também está relacionada com a proliferação celular (SONG *et al*, 2007). Cabe ressaltar que neste estudo não foram analisados ratos com a idade intermediária de 13 meses. Além disso, os animais utilizados foram

ratos Sprague Dawley, diferentemente do utilizado no nosso trabalho que foram ratos Wistar.

Não foram encontrados na literatura outros relatos sobre a modulação da via da Akt no SNC durante o envelhecimento. Todavia, um trabalho recente estudando o efeito do envelhecimento e da restrição alimentar sobre a resposta hipotalâmica à insulina e à sinalização da insulina, descreve que a estimulação da fosforilação da Akt, pela administração intracerebroventricular de insulina, foi menor em ratos Wistar de 8 e 24 meses comparando-se com os de 3 meses de idade. A expressão da Akt total não modificou com a idade nem mesmo com a infusão de insulina. Além disso, a ativação do receptor de insulina também foi menor nos animais velhos em resposta à insulina (GARCÍA-SAN FRUTOS *et al*, 2007). Williams e colaboradores (2007) mostraram que em ratos jovens o receptor (TrKA) e a fosforilação da ERK são rapidamente aumentadas após a infusão hipocampal de NGF (fator de crescimento neural) no prosencéfalo, porém esta resposta foi diminuída em ratos velhos e estas mudanças independeram da alteração da ERK total.

Com relação ao efeito da diabete na via da Akt, nossos resultados também foram interessantes e poderiam justificar as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas estruturas encefálicas decorrentes desta doença. No hipocampo e no hipotálamo de ratos diabéticos houve uma redução da relação Akt fosforilada/Akt total de 33% e de 23,4%, respectivamente, comparando-se com seus grupos controle não-diabéticos. Além disso, a expressão da Akt fosforilada foi reduzida 34% no hipocampo e 17,6% no hipotálamo em relação aos grupos controle. Porém, não houve alteração na expressão da Akt total nestas duas estruturas com relação ao efeito da doença. Sendo assim, o fato da Akt fosforilada e da relação desta com o seu conteúdo total encontrarem-se reduzidos na diabete, tanto no hipocampo como no hipotálamo, pressupõe que a ativação enzimática da proteína também esteja reduzida, resultando numa inibição desta via promotora da sobrevivência nestas estruturas do SNC atingidas pela diabete.

A ativação da Akt parece ser regulada pela concentração de glicose. Em camundongos, com restrição alimentar por 24 horas, houve redução da glicemia e tal fato foi associado com a diminuição da fosforilação da Akt e da GSK3 $\alpha$  e  $\beta$  no hipocampo e no córtex cerebral, e a administração de glicose e de insulina

reverteram essas reduções (CLODFELDER-MILLER *et al*, 2005). Porém, a diabetes induzida por estreptozotocina (que promove a degeneração das células  $\beta$  do pâncreas secretoras de insulina) promoveu um aumento da fosforilação da Akt e da GSK3 no hipocampo e no córtex cerebral de camundongos após 3 dias da injeção da droga, porém sem aumentar a expressão da Akt total (CLODFELDER-MILLER *et al*, 2005), ao contrário dos nossos resultados obtidos após 5 semanas. Estes dados mostraram uma regulação a curto prazo da hiperglicemia sobre a fosforilação da Akt numa situação patológica. Por outro lado, em adipócitos epididimais, houve uma redução da fosforilação da Akt. Além disso, após 4 semanas da indução da diabetes por estreptozotocina em camundongos, este aumento da fosforilação da Akt ainda permaneceu. Então, ao contrário do evidenciado no nosso trabalho, estruturas do SNC, neste caso o hipocampo e o córtex cerebral de camundongos, a diabetes induzida por estreptozotocina promoveu um aumento da fosforilação logo no terceiro dia e permaneceu após 4 semanas. Na hipófise anterior de ratos Wistar com diabetes induzida, seguindo nosso mesmo protocolo de injeção da estreptozotocina, houve um aumento na fosforilação da Akt na 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas comparando-se com animais controles. Porém, não houve diferença em relação à expressão da Akt fosforilada na 4<sup>a</sup> semana em relação ao controle e apenas nesta semana foi encontrado um aumento da fosforilação da ERK. O receptor de IGF-I aumentou após todos os períodos (ARROBA *et al*, 2007) e a morte. Sendo assim, especula-se que ocorra uma ativação de mecanismos para garantir a sobrevivência celular diante de fatores lesivos, como a hiperglicemia crônica, presente na diabetes. Todavia, é possível que os animais diabéticos do nosso experimento não tenham conseguido ativar esses mecanismos, e provavelmente, a sobrevivência neuronal estaria ainda mais prejudicada devido à inibição desta via.

Em outros estudos, a diabetes promoveu uma inibição da via da Akt. No músculo sóleo de ratos diabéticos por estreptozotocina houve uma menor fosforilação da Akt quando comparados com ratos tratados com resveratrol, um componente encontrado na uva e no vinho tinto que apresenta diversos efeitos farmacológicos, incluindo efeito antioxidante, anticarcinogênico, cardioprotetor e antidiabético (CHI *et al*, 2007; AL-AWWADI *et al*, 2004, AGGARWAL *et al*, 2004, HUNG *et al*, 2004). No nervo vago de ratos com diabetes induzida por

estreptozotocina, a atividade da PI3-K e da Akt foram reduzidas, porém sem alteração na expressão da subunidade p85 da PI3K, da Akt e da Akt fosforilada após 16 semanas. Porém, em neurônios aferentes vagais do gânglio nodoso, a diabetes induziu uma diminuição global na imunorreatividade da subunidade p85 da PI3-K e da Akt fosforilada (CAI & HELKE, 2003). No córtex frontal de ratos com diabetes do tipo 1 e do tipo 2, houve uma redução da fosforilação da Akt acompanhada da redução da fosforilação de GSK3 $\beta$ , o que poderia estar relacionado com a perda neuronal e com a degeneração neurítica encontrada (LI *et al*, 2007).

Assim como no envelhecimento, estas alterações na via da Akt na diabetes podem ser consequência de modificações nas vias efetoras em pontos anteriores na cascata de sinalização. Níveis circulantes de IGF-I e a expressão gênica do IGF-I no encéfalo e em nervos periféricos diminuem em pacientes e em ratos com diabetes do tipo 1 e 2 (TAN & BAXTER, 1986; ISHII *et al*, 1994; WUARIN *et al*, 1994). Além disso, a perda da atividade IGF-I em animais não-diabéticos pode mimetizar os sintomas dos distúrbios neurológicos da diabetes (LUPIEN *et al*, 2003). A expressão do receptor de insulina no córtex frontal diminui nos ratos diabéticos do tipo 1, mas não no tipo 2. Porém, há redução do receptor IGF-I nos dois modelos experimentais quando comparados com o grupo controle (LI *et al*, 2007). Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, a perda do desempenho cognitivo foi associada com alteração da plasticidade hipocampal e estas mudanças são revertidas com a administração de insulina (BIESSELS *et al*, 1998). Em modelo de ratos pré-diabéticos BB/WOR, modelo de diabetes do tipo 1, houve disfunção cognitiva progressiva e esta estava associada com a supressão das ações da insulina e do IGF-I e com a apoptose dos neurônios do hipocampo pela redução na expressão do IGF-I, IGF-II e receptores de IGF-I e de insulina. (LI *et al*, 2002). Animais diabéticos sem controle da glicemia, apresentaram menores níveis da proteína IGF-I no cerebelo, ao passo que não foi encontrada alteração na expressão do RNAm. Já os ratos que tiveram a glicemia dentro da faixa normal, tiveram níveis normais de IGF-I no cerebelo (BUSIGUINA *et al*, 1996).

A resistência para a ação de fatores de crescimento e da insulina no sistema nervoso central pode correlacionar-se com a resistência à insulina encontrada em tecidos periféricos na diabetes. A perda da responsividade das células para a ação da

insulina e do IGF-I poderia tornar os neurônios mais suscetíveis aos danos neurotóxicos, por uma diminuição da ativação das vias de sinalização desencadeadas por essas moléculas, como a da Akt, aumentando a apoptose e a neurodegeneração, levando conseqüentemente à encefalopatia diabética.

Os esteróides neuroativos, incluindo-se aqui tanto os oriundos da síntese por glândulas periféricas como os neuroesteróides, exercem uma ampla diversidade de funções no SNC e SNP, estando envolvidos em determinados comportamentos, como ansiedade e depressão, na neurogênese, sendo essenciais para o crescimento de neuritos (axônios e dendritos), e para a mielinização e neuroproteção contra danos provocados por hipóxia, estresse oxidativo, hiperglicemia e substâncias citotóxicas (BASTIANETTO *et al*, 1999; ARAGNO *et al*, 1999; SCHUMACHER *et al*, 2001; BUCOLO *et al*, 2005; XILOURI *et al*, 2007; MELLON, 2007).

As taxas de produção e os níveis hormonais declinam com a idade, aumentando a vulnerabilidade de neurônios a processos neurodegenerativos e a probabilidade de desenvolver sintomas depressivos (BAULIEU, 1997; WEILL-ENGERER *et al*, 2002, AZCOITIA *et al*, 2003; SONNTAG *et al*, 2005). Os níveis de DHEA e DHEAS aumentam no plasma humano durante a puberdade e diminuem gradualmente com o envelhecimento (ORENTREICH *et al*, 1992; LAMBERTS *et al*, 1997), o que reforça a hipótese de que sua redução seja uma das causas da disfunção metabólica e hormonal que ocorre com o avançar da idade.

Embora DHEA e DHEAS sejam esteróides abundantes produzidos pelas supra-renais humanas, estes esteróides também estão presentes em altas concentrações no encéfalo de diversas espécies e são sintetizados de novo em neurônios e astrócitos (ZWAIN & YEN, 1999, a,b). Os níveis circulantes de DHEA em ratos são de aproximadamente 1nM (CORPÉCHOT, 1981). Porém, apesar das evidências de sua ação em diversos processos fisiológicos, permanecem as especulações sobre os candidatos a receptor deste esteróide e sua função ainda não foi claramente delineada.

A desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), está associada com os déficits cognitivos que ocorrem no envelhecimento. Ao contrário da maioria dos esteróides, a produção adrenal de glicocorticóides é mantida ao longo da vida. Porém, o encéfalo torna-se mais sensível ao cortisol circulante com a progressão do

envelhecimento devido à redução da DHEA, que também atua como um antiglicocorticóide (KIMONIDES *et al*, 1999). Níveis elevados de glicocorticóides representam um risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (NICHOLS *et al*, 2001). Em pacientes com a doença de Alzheimer, foi encontrada uma diminuição dos níveis circulantes da relação DHEA-S/cortisol, sugerindo que DHEAS poderia exercer um efeito protetor, diminuindo o efeito deletério do cortisol nas células hipocâmpais (LEBLHUBER *et al*, 1992).

No envelhecimento, o tratamento com DHEA pode contribuir para a manutenção da função do sistema endócrino, tendo em vista que pode reverter a diminuição de hormônios hipotalâmicos e hipofisários. No encéfalo de ratos velhos e jovens, de ambos os gêneros, a DHEA estimula a biossíntese do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (LI *et al*, 1997). Na hipófise anterior de ratos machos jovens (50-55 dias), a DHEA induziu aumento de 17,5% do RNAm da POMC (proopiomelanocortina). Em ratos machos velhos (18 meses), o RNAm da POMC apresentou uma diminuição de 22% do detectado em jovens e o tratamento com DHEA produziu um aumento de 26%, restaurando os níveis da POMC. Na hipófise anterior de ratas fêmeas jovens, a DHEA não modificou os níveis de RNAm da POMC, mas houve uma redução com relação à idade, cerca de 24%, e o tratamento com DHEA reverteu essa redução. Estes dados indicam uma redução relacionada com a idade na atividade neuronal do hormônio de liberação da corticotrofina, que está associada com inibição do eixo HPA e que o tratamento com DHEA pode exercer influência benéfica no eixo hipotalâmico, revertendo a diminuição do RNAm da POMC (GIVALOIS & PELLETIER, 1999). Além disso, pela hibridização *in situ* do RNAm do hormônio liberador de corticotrofina no hipotálamo de ratos com 50 dias e 18 meses, de ambos os sexos, o RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) reduziu 20% nos animais velhos e o tratamento com DHEA em ratos jovens aumentou a expressão do RNAm do CRH e reverteu esta diminuição nos animais velhos (GIVALOIS *et al*, 1997).

Um estudo de quantificação de neuroesteróides em pacientes com doença de Alzheimer, realizado por Schumacher e colaboradores (2003), por espectrometria de massa, demonstrou que há uma tendência geral de haver baixos níveis de neuroesteróides em diferentes regiões do encéfalo e uma correlação inversa entre

as concentrações de neuroesteróides e as proteínas tau-fosforiladas e peptídeos beta-amilóide, marcadores bioquímicos desta doença neurodegenerativa.

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por disfunção progressiva e morte de neurônios. A neurodegeneração pode ocorrer por apoptose, necrose ou ambas. Acredita-se que há diversos mecanismos diferentes e moduladores neuroquímicos responsáveis pelo dano ao sistema nervoso central, os quais podem se sobrepor temporariamente. Entre os fatores mais importantes que contribuem para a morte neuronal estão os fatores genéticos, a excitotoxicidade mediada por glutamato, levando ao desequilíbrio no metabolismo do cálcio e do sódio intracelular, a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo, a retirada de fatores de crescimento, as citocinas e as toxinas (VAJDA, 2002).

O entendimento das bases moleculares de ação da DHEA é imprescindível para responder a questões referentes aos mecanismos intracelulares pelos quais este hormônio exerce suas funções, promovendo efeitos cardioprotetores, antidiabéticos, antienvhecimento e neuroprotetor. Os resultados encontrados neste estudo, com relação ao efeito de diferentes protocolos de administração da DHEA sobre a via da Akt em estruturas do SNC, podem contribuir para o esclarecimento de vias intracelulares reguladas por este esteróide em diferentes parâmetros fisiológicos e com diferentes protocolos de tratamento, levantando a discussão referente tanto à dose adequada, como também ao período de tratamento para a promoção de efeitos neuroprotetores. Por fim, os resultados poderiam contribuir para justificar, ou não, o seu uso terapêutico.

Com relação ao efeito do tratamento agudo e crônico com DHEA, os resultados da relação Akt fosforilada /Akt total e da expressão da Akt fosforilada e da Akt total variaram com relação ao período de tratamento, com a idade do animal assim como com a estrutura analisada. Além disso, nos animais diabéticos tratados com DHEA, a relação da Akt fosforilada /Akt total e a expressão da Akt fosforilada foi aumentada apenas no hipotálamo.

No hipocampo de ratos adultos, o tratamento com DHEA aumentou a relação Akt fosforilada/Akt total após 6 e 24 horas em relação ao grupo tratado com veículo. Porém, este efeito foi específico para a dose de 50 mg/kg no período de 6 horas enquanto que, em 24 horas, a relação aumentou em todas as doses testadas. Em 6

horas, a expressão da Akt fosforilada aumentou em torno de 40% apenas na dose de 50 mg/kg, e não foi encontrada alteração da expressão da Akt total. Sendo assim, como a expressão da Akt total não foi modificada com nenhuma das doses testadas, o efeito do aumento da fosforilação da Akt após o tratamento com DHEA provavelmente seja independente da síntese da Akt total, dentro deste período de 6 horas. É possível que no hipocampo a regulação da fosforilação esteja ocorrendo por um outro mecanismo, seja pela ativação de proteínas de membrana ativadoras da PI3-K, seja por modulação do estado redox celular ou por outras vias intracelulares, as quais modulam a atividade enzimática da Akt.

Entretanto, em 24 horas após o tratamento, tanto a expressão da Akt fosforilada como da Akt total aumentaram na dose de 50 mg/kg, 40% e 14 %, respectivamente. Neste caso, no período de 24 horas poderia estar ocorrendo um aumento da síntese da Akt total, o que se reflete na maior expressão da Akt fosforilada. Para confirmar este fato seria necessário o uso de outra técnica para a quantificação da expressão do RNAm da Akt, como a reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa (RT-PCR). A relação Akt fosforilada/Akt total elevada nas demais doses no período de 24 horas após a injeção da DHEA poderia ser justificado pela redução da expressão da Akt total de 13% e de 15% nas doses 5 e 10 mg/kg, respectivamente, mas esse dado não foi significativo. Portanto, no hipocampo de ratos adultos o tratamento com DHEA aumentou a fosforilação da Akt após 6 horas de tratamento, mantendo-se após 24 horas na maior dose (50mg/kg). A expressão da Akt total aumentando no período maior poderia contribuir para o aumento da Akt fosforilada. Porém, mesmo assim, a relação entre as duas manteve-se elevada, sugerindo uma modulação da ativação enzimática.

No hipotálamo, a relação Akt fosforilada/Akt total e a expressão da Akt fosforilada aumentaram apenas após 24 horas de tratamento com a dose maior (50mg/kg), enquanto não houve alteração da Akt total em nenhum período ou outra dose testada. Esses dados, portanto, podem evidenciar uma modulação da ativação da Akt pela DHEA na dose de 50mg/kg no hipotálamo após 24 horas, de forma similar ao que se observou no hipocampo para este mesmo período. Porém, após 6 horas de tratamento, não foi encontrada nenhuma diferença no hipotálamo tanto na relação Akt fosforilada/Akt total, como também na expressão destas proteínas

isoladamente. É possível que as estruturas, hipocampo e hipotálamo, apresentem sensibilidade diferente ao tratamento com DHEA e a própria via poderia responder mais prontamente dependendo de inúmeros fatores e mecanismos presentes em cada estrutura, como a concentração de IGF-I, por exemplo. Cabe ressaltar que ocorreu aumento da relação Akt fosforilada/Akt total após 6 horas de tratamento apenas no hipocampo e que a via da Akt também está relacionada com mecanismos de plasticidade sináptica e de consolidação da memória (HORWOOD *et al*, 2006), processos que ocorrem no hipocampo. Por outro lado, há relatos de que a DHEA melhora a memória devido a seus efeitos em sistemas de receptores para neurotransmissores, como o GABA<sub>A</sub> (BAULIEU *et al*, 1999). A DHEA aumenta a neurogênese no hipocampo e antagoniza o efeito inibitório dos glicocorticóides na sobrevivência neuronal e na formação de novos neurônios (KARISHMA & HERBET, 2002).

O efeito da DHEA após 24 horas no hipotálamo poderia ocorrer de forma indireta por sua conversão a estradiol, ou usando as mesmas vias intracelulares. O tratamento com estradiol aumentou a fosforilação da Akt no hipotálamo de ratas ovariectomizadas após 6 e 24 horas, sendo neste último período maior que 6 horas. Após 48 horas, os níveis retornaram aos valores dos grupos controle. No hipocampo, no córtex cerebral e no cerebelo, o tratamento com estradiol aumentou moderadamente a fosforilação após 6 e 12 horas da administração de estradiol, mas não no período de 24 horas. O aumento na fosforilação da Akt foi detectado exclusivamente na dose maior testada (300µg) e doses menores (100 µg e 10 µg) não tiveram efeito. Após 6 horas de tratamento com IGF-I, houve um aumento na fosforilação da Akt no hipotálamo. Foi testado o efeito do tratamento com estradiol 24 horas e IGF-I 6 horas antes da morte, porém o efeito combinado do tratamento não foi significativamente diferente dos tratamentos separados no hipotálamo, mas foi diferente dos níveis do controle. Infusão intracerebroventricular por 6 dias com IGF-I foi incapaz de aumentar a fosforilação da Akt. Porém, em animais com infusão de veículo por 6 dias e com tratamento com estradiol por 24 horas, houve um aumento da fosforilação. Entretanto, o hipotálamo de animais que receberam infusão intracerebroventricular de IGF-I mostrou um aumento de cerca de 4 vezes em resposta ao tratamento com estradiol por 24 horas, comparados com animais com

infusão apenas com veículo, mostrando um efeito sinérgico do estadiol e do IGF-I (CARDONA-GOMEZ *et al*, 2002).

O efeito do tratamento crônico com DHEA na via da Akt em ratos em diferentes condições homeostáticas, como idade e diabetes, diferiu com relação à idade do animal, à doença e com a estrutura em questão. Os resultados de cada idade foram analisados separadamente, junto com seu controle 3 meses, tendo em vista que houve diferença na expressão da Akt no hipocampo dos grupos controle adultos (3 meses) usados em cada experimento. Tal fato poderia ser justificado porque em cada experimento foram utilizados animais diferentes e, além disso, foram realizados em momentos diferentes do ano. O tratamento crônico com DHEA em animais com 3 meses de idade não alterou a relação da Akt/fosforilada, assim como a expressão da Akt fosforilada e da Akt total nas duas estruturas analisadas nos experimentos realizados para comparar animais de 3 meses com 13 e com 21 meses, e com animais diabéticos com 3 meses de idade. Entretanto, no experimento realizado para verificar o efeito do tratamento crônico com DHEA no hipocampo de animais com 18 meses, houve diferença na expressão da Akt fosforilada nos animais adultos (3 meses) tratados, sendo encontrada uma queda estatisticamente significativa de 10,8% e nenhuma alteração da Akt total comparando-se com animais da mesma idade não tratados. Além disso, a relação também diminuiu cerca de 16 %. Porém, no hipocampo de animais da mesma idade que fizeram parte dos demais experimentos com tratamento crônico, tal efeito não foi encontrado, como já mencionado anteriormente. Este resultado foi surpreendente, uma vez que todos os experimentos crônicos foram realizados pelas mesmas pessoas, usando os mesmos procedimentos e reagentes e os animais eram provenientes do mesmo biotério. Por outro lado, deve-se considerar que o tratamento foi realizado com animais diferentes e em períodos diferentes do ano, o que pode trazer uma variabilidade muito grande. Além disso, os experimentos realizados *in vivo* podem ser influenciados por outros fatores de difícil controle e detecção. Também, como já discutido anteriormente, o hipocampo é uma estrutura no qual o processo da neurogênese ocorre constantemente em animais adultos e está relacionado com o aprendizado e a memória e as circunstâncias ambientais também poderiam estar interferindo. Porém, este efeito não se repetiu nos demais

experimentos e, portanto, consideramos que este efeito foi isolado para este grupo, e fisiologicamente talvez não tenha efeito expressivo nesta idade.

Embora o tratamento agudo em ratos de 3 meses tenha aumentado no hipocampo a relação Akt fosforilada/Akt total, assim como a expressão da Akt fosforilada após 24 horas, o tratamento crônico por 5 semanas com DHEA não foi efetivo sobre a via da Akt. Porém, deve-se levar em consideração que os experimentos foram distintos, uma vez que a via de administração no experimento agudo foi uma dose única intraperitoneal de DHEA diluída em  $\beta$ -ciclodextrina, enquanto que para o experimento crônico a DHEA foi diluída em óleo e injetada subcutaneamente, o que teria um efeito mais prolongado. Cabe ressaltar ainda, que a dose do experimento agudo que promoveu alteração na via equivale a 5 vezes (50mg/kg) ao valor semanal da dose injetada no tratamento crônico (10mg/kg), o que, a longo prazo, poderia ser metabolizado pelo organismo para a formação periférica de outros esteróides ou até mesmo ser sulfatada. Além disso, o tempo prolongado de tratamento pode envolver outros mecanismos regulatórios que não foram ativados no tratamento agudo.

Da mesma forma, no hipotálamo, o tratamento crônico com DHEA em animais adultos (3 meses) não modificou a relação da Akt fosforilada/Akt total, bem como a expressão da Akt fosforilada e da Akt total em todos os experimentos. De qualquer forma, não é possível afirmar com segurança que o tratamento com DHEA modula a via da Akt no SNC de animais que não estão sob esses processos de injúria, ou seja, em ratos adultos normais. Torna-se relevante neste caso a duração do tratamento. Tal fato pode ser importante devido ao uso da DHEA por jovens e adultos de forma crônica, como fonte da juventude e provedora do bem-estar (LABRIE *et al*, 2005). Todavia, seus efeitos benéficos para o sistema nervoso central ainda são controversos e esta questão permanece em aberto. Há inclusive relatos de que a DHEA não apresenta efeitos antidepressivos, mas sim tem resposta pró-depressiva em ratas fêmeas durante o diestro II (ANDRADE *et al*, 2007).

No hipocampo de ratos com 13 meses, o tratamento crônico com DHEA diminuiu a relação Akt fosforilada/Akt total cerca de 39%. Além disso, a expressão da Akt fosforilada encontra-se diminuída (45%). Porém, a expressão da Akt total em ratos com 13 meses tratados com DHEA aumentou 20,6%, o que incrementaria a

queda da relação. Então, embora o tratamento crônico com DHEA em animais com 13 meses induza aumento da Akt total, este não foi acompanhado por um aumento da fosforilação da Akt nestes animais, pois o tratamento reduziu ainda mais a Akt fosforilada, que encontrava-se reduzida nesta idade. Respostas diferentes nos experimentos com animais de 18 e de 21 meses foram encontradas com relação à expressão da Akt no hipocampo. O tratamento crônico com DHEA não modificou a relação Akt fosforilada/Akt total comparando-se com animais da mesma idade. Porém, houve um aumento da Akt fosforilada de 10,8% e 19,6%, respectivamente. Este aumento foi acompanhado por um aumento da Akt total (29,6% e 22,8% para animais com 18 e com 21 meses de idade, respectivamente) comparando-se com ratos da mesma idade não tratados. Portanto, o aumento da Akt fosforilada poderia ser devido ao aumento da Akt total.

Assim como no hipocampo, o tratamento crônico com DHEA no hipotálamo de animais com 13 meses diminuiu a relação da Akt fosforilada/Akt total cerca de 19,2% em relação ao grupo da mesma idade tratado com veículo. A expressão da Akt fosforilada também foi reduzida no hipotálamo após o tratamento crônico, 26%, mas não houve alteração da Akt total com o tratamento, no hipotálamo de ratos com 13 meses. Portanto, o tratamento crônico com DHEA reduziu a fosforilação da Akt, sugerindo uma redução da atividade da enzima com o tratamento. No hipotálamo de animais de 18 e de 21 meses, não foi encontrada diferença com relação ao efeito do tratamento crônico com DHEA na relação da Akt fosforilada e da Akt total, assim como da expressão destas proteínas isoladamente.

Há evidências de que o tratamento com DHEA em animais diabéticos reduz o estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia crônica e melhora a sensibilidade dos tecidos para a ação da insulina e para a captação de glicose. A administração de DHEA, 4mg/dia por 3 semanas por gavagem, em ratos hiperglicêmicos protegeu contra o estresse oxidativo pois promoveu menor lipoperoxidação no fígado, rim, e homogenato encefálico. No fígado e rim, o tratamento restaurou os níveis de glutathione próximo aos valores do controle assim como a atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. No encéfalo, apenas a catalase teve sua atividade aumentada (ARAGNO *et al*, 1999). Após 14 dias de tratamento com DHEA (4mg/dia), houve uma redução da ativação do NF- $\kappa$ B

no hipocampo de ratos diabéticos e isto foi mais evidente após 21 dias de tratamento. Tal fato estava relacionado com o efeito antioxidante deste esteróide, pois as espécies reativas de oxigênio atuam com mediadores intracelulares da fosforilação do IKB, ativando NF- $\kappa$ B, que sua vez transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde regula a transcrição de genes capazes de codificar para a formação de citocinas e de moléculas de adesão que estão envolvidas no dano e morte neuronal (ARAGNO *et al*, 2002).

No presente trabalho, o tratamento crônico com DHEA por 5 semanas não promoveu mudanças dos níveis de glicemia nos animais diabéticos, embora existam estudos mostrando que o tratamento com este hormônio aumenta a captação de glicose em outros tecidos e estimula a responsividade dos tecidos à ação da insulina. O tratamento agudo de adipócitos com DHEA estimulou a translocação do transportador de glicose responsivo à insulina, GLUT1 e 4 para a superfície da célula com o aumento da captação de glicose por estas células (PERRINI *et al*, 2004, ISHIZUKA *et al*, 1999). DHEA em adipócitos aumentou a captação de glicose por 30 minutos e o pré-tratamento aumentou a captação de glicose induzida por insulina sem alterar a autofosforilação do receptor insulínico. Esse trabalho propõe que a DHEA estimula tanto PI3-K como PKC para aumentar a captação de glicose (ISHIZUKA *et al*, 1999). O tratamento com DHEA em ratos diabéticos por 2 semanas aumenta a captação de glicose estimulada por insulina *in vivo* (ISHIZUKA *et al*, 1999). A administração de DHEA em roedores e em humanos reduziu a gordura visceral e melhorou a sensibilidade à insulina (MUKASA *et al*, 1998; VILLAREAL & HOLLOSZY, 2004). O tratamento com DHEA com uma dose única de 10mg/kg durante 1 semana, com injeção subcutânea em ratos velhos com 1 ano de idade, aumentou a massa de células  $\beta$ , acompanhado por uma aumento dos níveis protéicos da Akt 1, porém, causou redução do receptor de insulina, e dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1, 2) e aumento da secreção de insulina estimulada por glicose (MEDINA *et al*, 2006). Campbell e colaboradores, 2004, demonstraram que uma injeção de DHEA (10mg/kg) induziu aumento dos níveis deste esteróide a partir do primeiro dia do tratamento até o sétimo dia e induziu uma melhora na sensibilidade à insulina em ratos com 6 meses. Em ratos tratados com DHEA, 1 semana, 10mg/kg, subcutânea, não modificou os níveis do receptor de

insulina, e dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 no fígado e no músculo esquelético de ratos com 6 meses. Por outro lado, o tratamento aumentou a autofosforilação induzida por insulina IRS-1 fosforilação tirosina em ambos os tecidos, enquanto que o tratamento aumentou a fosforilação do receptor IRS-2 apenas no fígado. O tratamento aumentou os níveis de PI3-K e Akt fosforilada no fígado e PI3-K no músculo, mas não modificou a fosforilação da Akt neste último.

No hipocampo de ratos diabéticos tratados com DHEA avaliados no presente estudo, o tratamento não modificou a relação da Akt fosforilada/total e da expressão destas proteínas no hipocampo. Porém, no hipotálamo, a redução da relação e da Akt fosforilada foi revertida com a administração da DHEA, aumentando 26,8% e 18%, respectivamente, aproximando o estado de fosforilação aos níveis do grupo controle (não-diabético). Este aumento tanto da relação Akt fosforilada/Akt total, como da expressão da Akt fosforilada, no hipotálamo é essencial porque esta estrutura está envolvida em vários mecanismos homeostáticos, inclusive relacionados ao controle do metabolismo e de respostas internas diante de uma alteração metabólica. Tais efeitos seriam essenciais para os ratos acometidos pela diabetes do tipo 1, mantendo a capacidade de sobrevivência das células hipotalâmicas por retornar o estado de fosforilação da Akt ao dos ratos não diabéticos, garantindo, por fim, o funcionamento adequado desta estrutura. É possível que a DHEA exerça tal efeito via modulação dos níveis de IGF-I no hipotálamo.

Estudos *in vitro* mostraram que a DHEA modula a via da Akt. Foi demonstrado que em cultura de precursores neuronais embriogênicos, oriundos do prosencéfalo de ratos, o tratamento com 50 e 100nM de DHEA por 72 horas produziu aumento na fosforilação da Akt em relação ao grupo controle tratado com veículo (160 e 180%, respectivamente). A quantidade de Akt total foi constante em todas as concentrações de DHEA e durante todo o período, indicando que o aumento na fosforilação da Akt não poderia ser atribuído ao aumento da Akt total (ZHANG *et al*, 2002). A ativação da Akt na dose de 100nM já era detectável em 10 min e atingiu um platô em 30 min. Além disso, o tratamento com DHEA diminuiu o percentual de células apoptóticas em 30% e 50 % nas doses de 50 e de 100nM, respectivamente. O pré-tratamento com o inibidor da PI3-K diminuiu a ativação da

Akt induzida pela DHEA e bloqueou o efeito inibitório da DHEA sobre a apoptose. Ao contrário da DHEA, a DHEAS, tanto na concentração de 50 como na 100nM diminuiu significativamente a fosforilação da Akt já em 10 minutos, com máxima redução em 60 minutos. Essa redução da Akt fosforilada pelo tratamento com DHEAS foi associada com o aumento na percentual de células apoptóticas. Além da expressão da proteínas, a DHEA aumentou enquanto que a DHEAS diminuiu a atividade enzimática da Akt (ZHANG *et al*, 2002). A ausência do efeito do pré-tratamento com antagonistas dos receptores androgênicos e estrogênicos indica que a sinalização da Akt mediada por DHEA não envolveu esses receptores esteróides (ZHANG *et al*, 2002).

Os efeitos da DHEA na sobrevivência neuronal podem ser mediados por vias similares àquelas ativadas na indução dos efeitos neuroprotetores do estradiol. Até pouco tempo, pensava-se que a DHEA e a DHEAS não exerciam um efeito hormonal próprio pois nenhum receptor específico para DHEA foi encontrado, sendo considerados como pró-hormônios, exercendo efeitos androgênicos e estrogênicos indiretos seguindo a conversão periférica em testosterona e estradiol. Todavia, este conceito tem sido questionado devido à identificação de sítios de ligação para a DHEA na membrana plasmática de células endoteliais da aorta bovina (LIU & DILLON, 2002). Este receptor estaria funcionalmente acoplado à proteína G e os efeitos da DHEA seriam independentes da ação de estrogênicos (WILLIAMS *et al*, 2002; SIMONCINI *et al*, 2003; LIU & DILLON, 2004; LIU *et al*, 2007).

A estimulação de células endoteliais da aorta bovina com DHEA resultou em rápida fosforilação da Akt. Tal fato foi dependente da dose (sendo maior no intervalo de 15 e 30 minutos, na concentração de 1nM e em 15 minutos para as maiores concentrações). DHEA protegeu as células endoteliais vasculares bovina e de humanos contra a apoptose induzida por privação de soro. Este efeito foi dependente da dose e máximo em concentrações fisiológicas (0,1-10nM) e foi bloqueado quando foram incubadas com inibidor da PI-3K. A fosforilação da Akt e o efeito antiapoptótico da DHEA foi dependente da ativação de proteínas G, mas foram independentes da ação de receptores para estrogênicos (LIU *et al*, 2007). Em células endoteliais da aorta bovina o tratamento com insulina ou com DHEA (100nM, 5 min) aumentou a produção de óxido nítrico, a fosforilação da Akt e da óxido nítrico

sintase endotelial e o tratamento com inibidor da PI3-K inibiu estes efeitos (FORMOSO *et al*, 2006). Nestes estudos, a DHEA exerceu efeito imediato, por mecanismos não-genômicos, tendo em vista o pequeno intervalo de tempo para promoção de seus efeitos na produção de óxido nítrico nas células endoteliais via PI3-K.

Em neurônios P19-N, neuroesteróide sintético da DHEA mantém a sobrevivência, na ausência e na presença de NMDA, após 15 e 30 minutos (XILOURI *et al*, 2007). O tratamento com NMDA por 60 min suprimiu a fosforilação da Akt. Co-incubação com um inibidor da PI3-K reverteu completamente o aumento da fosforilação da Akt. Tais efeitos foram mediados pelo receptor GABA<sub>A</sub> pois a co-incubação com um antagonista deste receptor, bicuculina, aboliu a habilidade do esteróide sintético em aumentar a fosforilação da Akt. Além disso, o tratamento diminuiu a apoptose induzida por NMDA mantendo a ativação da PI3-K/Akt (XILOURI *et al*, 2007). Estes resultados sugerem que os neuroesteroides análogos podem atuar na membrana plasmática, tendo efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida por NMDA. Aumentos similares na fosforilação da Akt foram obtidos na presença de neuroesteróides endógenos como DHEA e alopregnenolona (XILOURI & PAPAFAFIRI, 2006).

A DHEA também tem ação antiproliferativa em cultura de células cancerígenas HepG2 e HT-29, linhagens celulares humanas de células cancerígenas. A DHEA aumentou a apoptose nas células HepG2 em todas as doses testadas (0, 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu$ M) sendo a de 100 $\mu$ M mais eficaz, e este aumento da apoptose estava relacionado com a diminuição da Akt fosforilada apenas nas doses 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M, sugerindo que a DHEA inibiu a via da Akt para induzir apoptose (JIANG *et al*, 2005), o que seria desejável em casos de câncer.

Estudos sobre o efeito da DHEA na viabilidade neuronal são controversos, usando diferentes modelos experimentais, a DHEA exerce efeito neuroprotetor (ARAGNO *et al*, 1999, 2000, 2002; BASTIANETTO *et al*, 1999; ZHANG *et al*, 2002, LI *et al* 2001; KARISHMA & HERBET 2002; XILOURI & PAPAFAFIRI, 2006) e neurotóxico (SAFIULINA *et al*, 2006; GIL-AD *et al*, 2001). Em outras regiões, como no fígado de ratos com 16 meses, a adição de 0,6% de DHEA na ração (dose equivalente a 2.000mg/dia em humanos) gerou hepatotoxicidade (MAYER &

FORSTNER, 2004). A disparidade do efeito da DHEA pode refletir diferenças em modelos celulares (diferenciação vs proliferação), regiões encefálicas ou modelos experimentais (morte celular induzida por estresse oxidativo ou por privação de soro).

Alguns efeitos crônicos da DHEA podem ser devidos a sua conversão a testosterona e estrogênio (LABRIE, 1991). Os efeitos observados de DHEA também podem ser indiretos pois esta pode ser metabolizada a outros produtos esteróides tanto por neurônios como pelas células gliais (ZWAIN & YEN, 1999 a, b). Pringle e colaboradores, 2003, mostraram que, em cultura organotípica de hipocampo expostos à hipóxia por 3 horas, estradiol, DHEA e epiandrosterona (EPIA) acrescentados antes, durante e depois da hipóxia, não protegeram contra o dano neuronal. Porém,  $7\alpha$  e  $7\beta$  hidroximetabólitos da EPIA reduziram a neurotoxicidade nas mesmas doses (100 nM) neste modelo de isquemia. Além disso,  $7\beta$  hidroxiePIA teve efeito neuroprotetor em dois modelos de isquemia cerebral in vivo, reduzindo a perda de neurônios hipocampais (PRINGLE *et al*, 2003).

DHEA induziu efeito neurotóxico na ausência de fator trófico (soro) e induziu apoptose de neurônios hipotalâmicos GT1-7 (LIN *et al*, 2004). Porém o co-tratamento com IGF-I e a consequente ativação da via da Akt é capaz de atenuar a morte celular induzida pela DHEA. Após 48 horas de tratamento com DHEA, houve uma redução do nível de Akt fosforilada em relação ao veículo apenas em neurônios hipotalâmicos GT1-7. Da mesma forma, os níveis de Akt total diminuíram após 48h da adição de DHEA, consistente com o fato de que a Akt é, como acontece com muitas outras moléculas de sinalização, degradada por caspases executoras durante a apoptose. Quando a razão de Akt fosforilada/Akt total foi calculada nenhuma diferença foi detectada em células expostas à privação de soro tanto com veículo como com DHEA, sugerindo que a diminuição da Akt fosforilada em neurônios tratados com DHEA é secundário à perda da Akt total e não porque regula a atividade da Akt (LIN *et al*, 2004). Tanto o IGF-I como o soro 5% evitaram a diminuição da Akt total induzida por DHEA e além disso estimularam a fosforilação da Akt. O IGF-I pode promover a sobrevivência celular na presença de DHEA via ativação da Akt e subsequente fosforilação e inativação da GSK3 $\beta$  (LI *et al*, 2004).

Existem evidências que sugerem que o IGF-I esteja envolvido nas ações da DHEA. Em vários tipos celulares existe uma relação entre o IGF-I e a DHEA. Estudos mostram um possível efeito estimulatório da DHEA nos níveis séricos de GH/IGF (GENAZZANI *et al*, 2001; BAULIEU *et al*, 2000). 13 homens e 17 mulheres (40-70anos) receberam, todas as noites, administração oral de DHEA, 50mg por 3 meses. Os níveis de DHEA e de testosterona foram restaurados aos valores de jovens adultos. O IGF-I aumentou e sua proteína ligadora diminuiu (MORALES *et al*, 1994). Um estudo com fêmeas jovens, implantes de DHEA na dose de 100mg aumentaram o GH após uma semana e causaram hiperplasia na hipófise (SUAREZ *et al*, 2002). No hipotálamo de ratos adultos, o tratamento com DHEA na dose de 50mg/kg induziu, após 24 horas, um aumento do IGF-I no local (RIBEIRO & GARCIA-SEGURA, 2002) o que poderia justificar nossos resultados referentes ao aumento da fosforilação da Akt no tratamento agudo com DHEA. Entretanto, neste estudo, os níveis do receptor de IGF nesta estrutura diminuíram com o tratamento, portanto, é possível que a ativação da via da Akt ocorra independente da sinalização IGF-I, por meio de outras proteínas receptoras ativadoras da via, acopladas à proteína G ou mesmo pelo receptor GABA<sub>A</sub>.

Há estudos sugerindo que DHEA poderia atuar em receptores estrogênicos, sem a sua conversão a estradiol. A DHEA pode se ligar diretamente a receptores de estrogênio *in vivo* em leveduras e promover a sua dimerização (NEPHEW *et al*, 1998). Porém, tal efeito exige concentrações 1.000 vezes maiores de DHEA do que de estrogênio. Em células do fígado de embriões humanos transfectados, que não possuem as enzimas para a conversão de DHEA em estrogênio, a DHEA liga-se diretamente ao receptor ER $\beta$  (LEMMEN *et al*, 2002). Outro estudo mostrou a ligação de DHEA ao receptor ER $\alpha$  em células de câncer de mama (MAGGIOLINI *et al*, 1999). Alguns metabólitos da DHEA, tais como androstenediol, 3 $\beta$  e 3 $\alpha$  androstenediol exercem fracas ações estrogênicas.

Deve ser salientado que no nosso estudo a DHEA foi administrada sistemicamente e, portanto, o tempo de duração da ação do hormônio não é comparável com estudos *in vitro*, nos quais os intervalos de tempo para os tratamentos são bastante curtos. Não foi testado em intervalos menores, portanto não se pode excluir que outros picos de fosforilação da Akt possam ocorrer antes

das 6 horas, ou entre 6 e 24 horas no tratamento agudo com DHEA. Um outro ponto importante que merece bastante consideração é a duração do tratamento. As propriedades dos esteróides neuroativos foram bem caracterizadas em diversos modelos de administração aguda, *in vitro*, mas faltam estudos das conseqüências a longo prazo da administração de tais compostos *in vivo* no sistema nervoso central com relação a vias intracelulares. Por outro lado, o estudo *in vivo* das vias de sinalização ativadas por esteróides neuroativos, entre eles a DHEA, no sistema nervoso é bastante recente. Deve-se considerar que os experimentos realizados *in vitro* não retratam exatamente o que pode estar ocorrendo no SNC de um organismo, pois pode existir uma interação entre as vias de sinalização desencadeadas por outros esteróides e o próprio controle das atividades encefálicas estão dentro de uma complexa interrelação de múltiplos fatores, incluindo fatores de crescimento, hormônios, citocinas, neuropeptídeos e neurotransmissores que não estão presentes nos meio de cultura. Por outro lado, e por essas mesmas razões, há menor variabilidade nos experimentos *in vitro* pois estes permitem que a manipulação farmacológica ocorra sem outros interferentes, fato de difícil realização *in vivo*.

Os esteróides neuroativos não apenas podem ter efeitos benéficos após injúria ou durante o progresso de certas doenças, mas também podem ser fatores chave para o saudável envelhecimento do sistema nervoso. A redução nos níveis de DHEA durante o envelhecimento pode tornar o sistema nervoso mais susceptível à degeneração, e a terapia com este hormônio pode tornar-se um componente das estratégias para um envelhecimento satisfatório. Mudanças biológicas no encéfalo durante o envelhecimento saudável, parecem ser mais sutis e podem ser parcialmente reversíveis. Estas mudanças principalmente envolvem encolhimento do corpo neuronal cerebral, diminuição na densidade de neuritos e sinapses, perda de receptores para neurotransmissores e ruptura da bainha de mielina. A DHEA pode exercer seus efeitos por regular os principais sistemas de neurotransmissão e de sinalização intracelular, via receptores de membrana ou pela sua transformação em outros esteróides, promovendo a viabilidade neuronal, desempenhando papel importante na mielinização, nos processos cognitivos, em particular, a memória e o aprendizado e na neuroproteção contra injúrias provocadas por hiperglicemia

crônica, característica da diabetes e pelo aumento do estresse oxidativo associado com o envelhecimento. Há pouca informação sobre as mudanças dos níveis de esteróides neuroativos no encéfalo de humanos. Como os esteróides presentes nos tecidos nervosos originam-se das glândulas endócrinas (hormônios esteróides) e da síntese local (neuroesteróide), mudanças nos níveis plasmáticos de esteróides com a idade não necessariamente refletem mudanças dos seus níveis no encéfalo como um todo e em cada estrutura, em particular.

Entretanto, a segurança da suplementação a longo prazo com DHEA é incerta. Tem sido discutido se a reposição hormonal com DHEA poderia aumentar o risco de câncer de mama, especialmente por sua conversão em estradiol (BUVAT, 2003). Embora a administração de DHEA em roedores tenha mostrado efeitos benéficos na prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e diabetes e antiobesidade, não está claro o quanto isto pode ser extrapolado para humanos. Apesar destas incertezas, a viabilidade da DHEA como um suplemento alimentar nos Estados Unidos resultou na sua administração em larga escala, sem supervisão médica, como um fármaco anti-envelhecimento (LABRIE *et al*, 2005). Apesar de inúmeros resultados obtidos em ratos é necessário que se obtenham mais evidências, em estudos a longo prazo em humanos, da segurança do tratamento com DHEA, bem como da sua real eficácia e das doses adequadas, uma vez que existem muitos resultados contraditórios na literatura científica até o momento.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

- 1 – É necessário que se analise separadamente a expressão da Akt total e fosforilada, tendo em vista que a regulação da fosforilação e da expressão protéica envolvem mecanismos diferentes.
- 2 – Tanto em ratos de diferentes idades como nos diabéticos, houve uma modulação da relação Akt fosforilada/Akt total no hipocampo e no hipotálamo.
- 3 – A idade parece ser um fator importante para a modulação da síntese da Akt total apenas no hipocampo.
- 4 – O tratamento agudo com DHEA modula a via da Akt no hipocampo e no hipotálamo.
- 5 – O efeito do tratamento crônico com DHEA sobre a via da Akt é dependente da idade dos ratos.
- 6 – A expressão da Akt total aumenta no hipocampo de ratos de 13, 18 e 21 meses de idade com o tratamento crônico DHEA.
- 7 – O hipotálamo parece ser mais sensível do que o hipocampo ao efeito do tratamento crônico com DHEA em animais diabéticos.

## 8. REFERÊNCIAS

AGGARWAL BB, BHARDWAJ A, AGGARWAL RS, SEERAM NP, SHISHODIA S, TAKADA Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, 24(5A):2783-840, 2004.

AKWA Y, SANANÉS N, GOUÉZOU M, ROBEL P, BAULIEU EE, LE GOASCOGNE C. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. **Journal of Cell Biology**, 121(1):135-143, 1993.

ALLOLIO B & ARLT W. DHEA treatment: myth or reality? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 13(7):288-294, 2002.

AL-AWWADI N, AZAY J, POUCHERET P, CASSANAS G, KROSNIAK M, AUGER C, GASC F, ROUANET JM, CROS G, TEISSÈDRE PL. Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocin-treated rats. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 52(4):1008-16, 2004.

ANDRADE S, SILVEIRA SL, GOMEZ R, BARROS HM, RIBEIRO MF. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 31(3):613-21, 2007.

ARAGNO M, TAMAGNO E, GATTO V, BRIGNARDELLO E, PAROLA S, DANNI O, BOCCUZZI G. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 26:1467-1474, 1999.

ARAGNO M, PAROLA S, TAMAGNO E, MANTI R, DANNI O, BOCCUZZI G. Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. **Biochemical Pharmacology**, 60:389-395, 2000.

ARAGNO M, MASTROCOLA R, BRIGNARDELLO E, CATALANO M, ROBINO G, MANTI R, PAROLA M, DANNI O, BOCCUZZI G. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. **Endocrinology**, 143(9):3250-3258, 2002.

ARAGNO M, MASTROCOLA R, MEDANA C, CATALANO MG, VERCELLINATTO I, DANNI O, BOCCUZZI G. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. **Endocrinology**, 147(12):5967-74, 2006.

ARROBA AI, LECHUGA-SANCHO AM, FRAGO LM, ARGENTE J, CHOWEN JA. Cell-specific expression of X-linked inhibitor of apoptosis in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Endocrinology** , 192(1):215-227, 2007.

ARUMUGAM TV, GLEICHMANN M, TANG SC, MATTSON MP. Hormesis/preconditioning mechanisms, the nervous system and aging. **Ageing Research Reviews**, 5(2):165-78, 2006.

ARUNDINE M & TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. **Cell Molecular Life Science**, 61: 657-668, 2004.

ARVANITAKIS Z, WILSON RS, BIENIAS JL, EVANS DA, BENNETT DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. **Archives of Neurology**, 61(5):661-666, 2004.

ATES O, CAYLI SR, YUCEL N, ALTINOZ E, KOCAK A, DURAK MA, TURKOZ Y, YOLOGLU S. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Clin Neurosci**, 14(3):256-60, 2007.

AZCOITIA I, DONCARLOS LL, GARCIA-SEGURA LM. Are gonadal steroid hormones involved in disorders of brain aging? **Ageing Cell**, 2(1):31-37, 2003.

AZCOITIA I, PEREZ-MARTIN M, SALAZAR V, CASTILLO C, ARIZNAVARRETA C, GARCIA-SEGURA LM, TRESGUERRES JAF. Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. **Neurobiology of Aging**, 26(5):697-703, 2005.

BARP J, ARAUJO AS, FERNANDES TR, RIGATTO KV., LLESUY, S., BELLÓ-KLEIN, A., SINGAL, P. Myocardial antioxidative and oxidative stress changes due to sex hormones. **Braz J Med Bio Res**, 35(9): 1075-81, 2002.

BARTHEL, A.; OKINO, S.T.; LIAO, J.; NAKATANI, K.; LI, J.; WHITLOCK, J.Jr.; ROTH, R.A. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. **Journal of Biological Chemistry**, 274:20281-20286, 1999.

BASTIANETTO S, RAMASSAMY C, POIRIER J, QUIRION R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. **Molecular Brain Research**, 66:35-41,1999.

BAULIEU EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) : A fountain of youth? **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 81 (9): 3147-3151, 1996.

BAULIEU EE. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. **Recent Progress in Hormone Research**, 52:1-32,1997.

BAULIEU EE & ROBEL P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95:4089-4091, 1998.

BAULIEU EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. **Psychoneuroendocrinology**, 23 (8): 963-987, 1998.

BAULIEU EE, ROBEL P, SCHUMACHER M. Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system. **Human Press Totowa**, 1999.

BAULIEU EE, THOMAS G, LEGRAIN S, LAHLOU N, ROGER M, DEBUIRE B, FAUCOUNAU V, GIRARD L, HERVY MP, LATOUR F, LEAUD MC, MOKRANE A, PITTI-FERRANDI H, TRIVALLE C, DE LACHARRIERE O, NOUVEAU S, RAKOTOARISON B, SOUBERBIELLE JC, RAISON J, LE BOUC Y, RAYNAUD A, GIRERD X, FORETTE F. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97:4279-4284, 2000.

BEHL C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nature Reviews Neuroscience**, 3(6):433-42, 2002.

BERR C, BALANSARD B, ARNAUD J, ROUSSEL AM, ALPÉROVITCH A. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. **Journal of the American Geriatrics Society**, 48(10):1285-1291, 2000.

BEYER C, PAWLAK J, KAROLCZAK M. Membrane receptors for oestrogen in the brain. **Journal of Neurochemistry**, 87(3):545-50, 2003.

BIESSELS GJ, KAMAL A, URBAN IJ, SPRUIJT BM, ERKELENS DW, GISPEN WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. **Brain Research**, 800(1):125-35, 1998.

BIESSELS GJ, VAN DER HEIDE LP, KAMAL A, BLEYS RL, GISPEN WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. **European Journal of Pharmacology**, 441:1-14, 2002.

BOHLEN UND HALBACH O & UNSICKER K. Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. **European Journal of Neuroscience**, 16:2434-2440, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72:248-54, 1976.

BRAZIL DP, PARK J, HEMMING BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. **Cell**, 111(3):293-303, 2002.

BROWN RC, CASCIO C, PAPADOPOULOS V. Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. **Journal of Neurochemistry**, 74(2):847-59, 2000.

BRYANT DN, SHELDAHL LC, MARRIOT LK, SHAPIRO RA, DORSA DM. Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids. **Endocrine**, 29(2):199-207, 2006.

BRYWE KG, MALLARD C, GUSTAVSSON M, HEDTJÄRN M, LEVERIN A-L, WANG X, BLOMGREN K, ISGAARD J, HAGBERG H. IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3 $\beta$ . **European Journal of Neuroscience**, 21:1489-1502, 2005.

BUCOLO C, DRAGO F, LIN L-R, REDDY VN. Neuroactive steroids protect retinal pigment epithelium against oxidative stress. **Neuroreport**, 16 (11):1203-1207, 2005.

BUSIGUINA S, CHOWEN JA, ARGENTE J, TORRES-ALEMAN I. Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. **Endocrinology**, (11):4980-7, 1996.

BUVAT J. Androgen therapy with dehydroepiandrosterone. **World Journal of Urology**, 21:346-355, 2003.

CAI F & HELKE CJ. Abnormal PI3 kinase/Akt signal pathway in vagal afferent neurons and vagus nerve of streptozotocin-diabetic rats. **Brain Res Mol Brain Res**. 20;110(2):234-44, 2003.

CAMPBELL, C.S.G.; CAPERUTO, L.C.; HIRATA, E.; ARAUJO, E.P.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.O. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. **Life Sciences**, 76:57-70, 2004.

CARDONA-GOMEZ GP, MENDEZ P, GARCIA-SEGURA LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. **Molecular Brain Research**, 107(1):80-88, 2002.

CARDONA-GOMEZ P, PEREZ M, AVILA J, GARCIA-SEGURA LM, WANDOSELL F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 25(3):363-73, 2004.

CARDOUNEL A, REGELSON W, KALIMI M. Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. **Proc Soc Exp Biol Med**, 222(2):145-9, 1999.

CARVALHO CR, BRENELLI SL, SILVA AC, NUNES AL, VELLOSO LA, SAAD M. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**, 137:151-159, 1996.

CASCIO C, BROWN RC, LIU Y, HAN Z, HALES DB, PAPADOPOULOS V. Pathways of dehydroepiandrosterone formation in rat brain glia. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 75(2-3):177-86, 2000.

CHAHAL HS & DRAKE WM. The endocrine system and ageing. **Journal of Pathology**. 211(2):173-80, 2007.

CHENG CM, MERVIS RF, NIU SL, SALEM Jr.N, WITTERS LA, TSENG V, REINHARDT R, BONDY CA. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. **Journal of Neuroscience Research**, 73:1-9, 2003.

CHI TC, CHEN WP, CHI TL, KUO TF, LEE SS, CHENG JT, SU MJ. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Science**, 10;80(18):1713-20, 2007.

CHIN PC, MAJZADEH N, D'MELLO SR. Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. **Molecular Brain Research**, 137(1-2):193-201, 2005.

CLODFELDER-MILLER B, DE SARNO P, ZMIJEWSKA AA, SONG L, JOPE RS. Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(48):39723-39731, 2005.

COLE GM & FRAUTSCHY SA. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. **Experimental Gerontology**, 42:10-21, 2007.

COMPAGNONE NA, BULFONE A, RUBENSTEIN JL, MELLON SH. Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. **Endocrinology**, 136(11):5212-23, 1995.

COMPAGNONE NA & MELLON SH. Dehydroepiandrosterone : a potential signalling molecule for neocortical organization during development. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95:4678-4683, 1998.

COMPAGNONE NA & MELLON SH. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 21:1-56, 2000.

CORPÉCHOT C, ROBEL P, AXELSON M, SJÖVALL J, BAULIEU, E.E. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78(8):4704-7, 1981.

CORPÉCHOT C, SYNGUELAKIS M, TALHA S, AXELSON M, SJÖVALL J, VIHKO R, BAULIEU EE, ROBEL P. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. **Brain Research**, 27;270(1):119-25, 1983.

D'ERCOLE AJ, YE P, CALIKOGLU AS, GUTIERREZ OSPINA G. The role of insulin-like growth factors in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, 13:227-255, 1996.

DATTA SR, RANGER AM, LIN MZ, STURGILL JF, MA YC, COWAN CW, DIKES P, KORSMEYER SJ, GREENBERG ME. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. **Developmental Cell**, (5):631-43, 2002

DORÉ S, KAR S, QUIRION R. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 9:4772-7, 1997.

DRISCOLL I & SUTHERLAND RJ. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. **Reviews Neuroscience**, 16:87-121, 2005.

DRÖGE W & SCHIPPER HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. **Aging Cell**, 6:361-370, 2007.

DUBROVSKY, BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 29: 169-192, 2005.

FELDMAN EL, SULLIVAN KA, KIM B, RUSSELL JW. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. **Neurobiology of Disease**, 4:201-14, 1997.

FORMOSO G, CHEN H, KIM J, MONTAGNANI M, CONSOLI A, QUON MJ. Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase- dependent pathways in vascular endothelium. **Molecular Endocrinology**, 20 (5):1153-1163, 2006.

FUTTERMAN LG & LEMBERG L. The Framingham Heart Study: a pivotal legacy of the last millennium. **American Journal of Critical Care**, 9(2):147-51, 2000.

GARCÍA-SAN FRUTOS M, FERNÁNDEZ-AGULLÓ T, DE SOLÍS AJ, ANDRÉS A, ARRIBAS C, CARRASCOSA JM, ROS M. Impaired central insulin response in aged Wistar rats: role of adiposity. **Endocrinology**, 148(11):5238-47, 2007.

GARCIA-SEGURA LM, PÉREZ J, PONS S, REJAS MT, TORRES-ALEMÁN I. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. **Brain Research**, 560:167-74, 1991.

GARCIA-SEGURA LM, AZCOITIA I, DONCARLOS LL. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, 63(1):29-60, 2001.

GASPARINI L & XU H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. **Trends Neuroscience**, 26(8):404-6, 2003.

GENAZZANI AD, STOMATI M, STRUCCHI C, PUCETTI S, LUISI S GENAZZANI AR Oral dehydroepiandrosterone supplementation modulates spontaneous growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone and insulin-like growth factor-1 secretion in early and late postmenopausal. **Fertility and Sterility**, 76:241-248, 2001.

GIL-AD I, SHTAIF B, ESHET R, MAAYAN R, REHAVI M, WEIZMAN A. Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture. **Isr Med Assoc J**, 3(9):639-43, 2001.

GIVALOIS L, LI S, PELLETIER G. Age-related decrease in the hypothalamic CRH mRNA expression is reduced by dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in male and female rats. **Molecular Brain Research**, 48:107-114, 1997.

GIVALOIS L, LI S, PELLETIER G. Effects of ageing and dehydroepiandrosterone administration on pro-opiomelanocortin mRNA expression in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. **Journal of Neuroendocrinology**, 11:737-742, 1999.

GRIMES CA & JOPE RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. **Progress in Neurobiology**, 65(4):391-426, 2001.

GURNELL EM & CHATTERJEE VK. Dehydroepiandrosterone replacement therapy. **European Journal of Endocrinology**, 145(2):103-6, 2001.

HAJSZAN T, MACLUSKY NJ, LERANTH C. Dehydroepiandrosterone increases hippocampal spine synapse density in ovariectomized female rats. **Endocrinology**, 145: 1042:1045, 2004.

HAMILTON ML, VAN REMMEN H, DRAKE JA, YANG H, GUO ZM, KEWITT K, WALTER CA, RICHARDSON A. Does oxidative damage to DNA increase with age? **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. 98(18):10469-10474, 2001

HARMAN D. Aging – A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **Journal of Gerontology**, 11 (3): 298-300, 1956.

HARMAN D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, 275: 257-266, 1992.

HAVRANKOVA J, ROTH J, BROWNSTEIN M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. **Nature**. 27;272(5656):827-9, 1978.

HECK S, LEZOUALC'H F, ENGERT S, BEHL C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. **Journal of Biological Chemistry**, 274(14):9828-35, 1999.

HOJO Y, HATTORI TA, ENAMI T, FURUKAWA A, SUZUKI K, ISHII HT, MUKAI H, MORRISON JH, JANSSEN WG, KOMINAMI S, HARADA N, KIMOTO T, KAWATO S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101(3):865-70, 2004.

HORWOOD JM, DUFOUR F, LAROCHE S, DAVIS S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 23,(12):3375-84, 2006

HU D, SERRANO F, OURY TD, KLANN E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. **Journal of Neuroscience**, 26(15):3933-41, 2006.

HUNG LM, SU MJ, CHEN JK. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, 15;36(6):774-81, 2004.

IKEYAMA S, KOKKONEN G, SHACK S, WANG XT, HOLBROOK NJ. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. **FASEB Journal**, 16(1):114-6, 2002.

ISHII DN, GUERTIN DM, WHALEN LR. Reduced insulin-like growth factor-I mRNA content in liver, adrenal glands and spinal cord of diabetic rats. **Diabetologia**, 37(11):1073-81, 1994.

ISHII, D.N. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Brain Research Reviews**, 20 (1):47-67, 1995.

ISHIZUKA T, KAJITA K, MIURA A, ISHIZAWA M, KANOY Y, ITAYA S, KIMURA M, MUTO N, MUNE T, MORITA H, YASUDA K. DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. **American Journal of Physiology**, 276:E196-204, 1999.

JACKSON SH, WEALE MR, WEALE RA. Biological age--what is it and can it be measured?. **Archives of gerontology and geriatrics**, 36(2):103-15, 2003.

JIANG Y, MIYAZAKI T, HONDA A, HIRAYAMA T, YOSHIDA S, TANAKA N, MATSUZAKI Y. Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. **Journal of Gastroenterology**, 40(5):490-7, 2005.

JOPE RS & JOHNSON GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends in Biochemical Sciences**, 29(2):95-102, 2004.

KAASIK A, KALDA A, JAAKO K, ZHARKOVSKY A. Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. **Neuroscience**, 102(2):427-32, 2001.

KALIMI M, REGELSON W. Physicochemical characterization of [3H] DHEA binding in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**, 156(1):22-9, 1988.

KANDEL ES & HAY N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. **Experimental Cell Research**, 253(1):210-29, 1999.

KANE LP, SHAPIRO VS, STOKOE D, WEISS A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. **Current Biology**, 9(11):601-4, 1999.

KARISHMA, K.K & HERBERT, J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. **European Journal of Neuroscience**. 16:445-453, 2002.

KATIC M & KAHN CR. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62(3):320-343, 2005.

KELLY MJ, RONNEKLEIV OK, IBRAHIM N, LAGRANGE AH, WAGNER EJ. Estrogen modulation of K(+) channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of the reproductive axis. **Steroids**, 67(6):447-56, 2002.

KEUKER JI.; LUITEN, P.G.; FUCHS, E. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. **Neurobiology of Aging**, 24:157-165, 2003.

KIBALY, C.; LAURENCE, M.; PATEE-MENSAH, C.; MENSAH-NYAGAN, A.G. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. **FASEB Journal**, 22(1):93-104, 2008.

KIM D & CHUNG J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 35(1):106-115, 2002.

KIMONIDES VG, KHATIBI NH, SVENDSEN CN, SOFRONIEW MV, HERBERT J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 1852-1857, 1998.

KIMONIDES VG, SPILLANTINI MG, SOFRONIEW MV, FAWCETT JW, HERBERT J. Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. **Neuroscience**, 89:429-436,1999.

KIMONIDES, V.G.; KHATIBI, N.H.; SVENDENSEN, C.N.; SOFRONIEW, J.;KLEIN JP, HAINS BC, CRANER MJ, BLACK JA, WAXMAN SG. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. **Neurobiology of Disease**, 15(2):221-8, 2004.

KLEIN JP, HAINS BC, CRANER MJ, BLACK JA, WAXMAN SG. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. **Neurobiology of Disease**, 15(2):221-8, 2004.

KLEMPIN,F & KEMPERMANN, G. Adult hippocampal neurogenesis and aging. **European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience**, 257:271-280, 2007.

KOH PO, WON CK, CHO JH. Estradiol prevents the injury-induced decrease of Akt/glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. **Neuroscience Letters**, 404(3):303-8, 2006.

KOHCHI C, UKENA K, TSUTSUI K. Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes p450scc, P450c17 and 3beta-HSD in the postnatal rat brain. **Brain Research**, 801:233-238,1998.

KOHN, A. D.; SUMMERS, S. A.; BIRNBAUM, M. J.; ROTH,R. A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 31372-31378, 1996.

KRASILNIKOV MA. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. **Biochemistry (Moscow)**, 65(1):59-67, 2000.

KULIK G & WEBER MJ. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. **Molecular and Cellular Biology**, 11:6711-6718, 1998.

LABRIE F. Intracrinology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 78(3):C113-8, 1991.

LABRIE F, BÉLANGER A, CUSAN L, GOMEZ JL, CANDAS B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. **J Clin Endocrinol Metab**, 82(8):2396-402, 1997.

LABRIE, F.; LUU-THE, V. ; BÉLANGER, A.; LIN, S-X.; SIMARD, J.; PELLETIER, G. Is dehydroepiandrosterone a hormone? **Journal of Endocrinology**, 187 : 169-196, 2005.

LAMBERTS S.W.J., VAN DER BELD A.W., VAN DER LELY A-J. The Endocrinology of Aging. **Science**, 278: 419-424, 1997.

LE FUR, G.; GUILLOT, F.; ALEXANDER, J.; MULLER, J.C. Research strategies in the pharmaceutical industry to cope with problems of ageing. **Comptes Rendus Biologies**, 325 (6) 643-654, 2002.

LE GOASCOGNE C.; ROBEL, P.; GOUEZOU M.; SANANES, N.; BAULIEU, E.E.; WATERMAN, M. NEUROSTEROIDS: cytochrome P-450scc in rat brain. **Science**, 237:1212-1215, 1987.

LEBLHUBER, F.; WINDHAGER,E.; NEUBAUER,C.; WEBER, J.; REISECKER,F.; DIENSTL, E. Antiglucoctiicoid effects of DHEA-S in Alzheimer's disease. **American Journal of Psychiatry**,149:1125-1126, 1992.

LEMMEN JG, VAN DEN BRINK CE, LEGLER J, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. Detection of oestrogenic activity of steroids present during mammalian gestation using oestrogen receptor alpha- and oestrogen receptor beta-specific in vitro assays. **Journal of Endocrinology**,174(3):435-46, 2002.

LI S, GIVALOIS L, PELLETIER G. Dehydroepiandrosterone (DHEA) administration reverses the inhibitory influence of aging on gonadotrophin-releasing hormone gene expression in the male and female rat brain. **Endocrine**, 6:265-270, 1997.

LI, H.; KLEIN, GM.; SUN, P.; BUCHAN, A .M. Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. **Brain Research**, 888:263-266, 2001.

LI ZG, ZHANG W, GRUNBERGER G, SIMA AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. **Brain Research**, 946(2):221-31, 2002.

LI, Z.G; ZHANG, W.; SIMA, A.AF. Alzheimer-like changes in rat models os spontaneous diabetes. **Diabetes**, 56:1817-1824, 2007.

LIN S-YJ, CUI H, YUSTA B, BELSHAM DD. IGF-I signaling prevents dehydroepiandrosterone (DHEA)-induced apoptosis in hypothalamic neurons. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 214:127-135, 2004.

LIU D & DILLON JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor couplet to G $\alpha_{i2,3}$ . **Journal of Biological Chemistry**, 277:21379-21388, 2002.

LIU D & DILLON JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. **Steroids**, 69:279-289, 2004.

LIU D, SI H, REYNOLDS KA, ZHEN W, JIA Z, DILLON JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a  $G\alpha_i$  protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. **Endocrinology**, 148 (7):3068-3076, 2007.

LUPIEN SB, BLUHM EJ, ISHII DN. Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. **J Neurosci Res**, 74(4):512-23, 2003.

LYNCH CD, LYONS D, KHAN A, BENNETT SA, SONNTAG WE. Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals. **Endocrinology**, 142(1):506-9, 2001.

MALIK AS, NARAYAN RK, WENDLING WW, COLE RW, PASHKO LL, SCHWARTZ AG, STRAUSS KI. A novel dehydroepiandrosterone analog improves functional recovery in a rat traumatic brain injury model. **Journal of Neurotrauma**, 20(5):463-76, 2003.

MAGGIOLINI M, DONZÉ O, JEANNIN E, ANDÒ S, PICARD D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. **Cancer Research**, 59(19):4864-9, 1999.

MAO, X. & BARGER, S.W. Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate : role of an NF-kappaB-like factor. **Neuroreport**, 9(4):759-763, 1998.

MARTINDALE JL & HOLBROOK NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, 192(1):1-15, 2002.

MARTINEAU LC, CHADAN SG, PARKHOUSE WS. Age-associated alterations in cardiac and skeletal muscle glucose transporters, insulin and IGF-1 receptors, and PI3-kinase protein contents in the C57BL/6 mouse. **Mech Ageing Dev**, 106(3):217-32, 1999

MATTSON MP. Brain evolution and lifespan regulation: conservation of signal transduction pathways that regulate energy metabolism. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123:947-53, 2002.

MATTSON MP & MAGNUS T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, 4:278-294, 2006.

MAYEUX R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review of Neuroscience**, 26:81-104, 2003.

MAYER D & FORSTNER K. Impact of dehydroepiandrosterone on hepatocarcinogenesis in the rat. **International Journal of Oncology**, 25(4):1021-30, 2004.

McEWEN B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Progress in Hormone Research**, 57:357-84, 2002.

MEDINA, M.C.; SOUZA, L.C.; CAPERUTO, L.C.; ANHÊ, G.F.; AMANSO, A.M.; TEIXEIRA, V. P.A.; BORDIN, S.; CARPINELLI, A.R.; BRITTO, L.R.G.; BARBIERI, R.L.; BORELLA, M. I.; CARVALHO, C.R.O. Dehydroepiandrosterone increases  $\beta$ -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters)**, 580:285-290, 2006.

MEIKLE AW, DORCHUCK RW, ARANEO BA, STRINGHAM JD, EVANS TG, SPRUANCE SL, DAYNES RA. The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 42:293-304, 1992.

MELLON, S.H.; GRIFFIN, L.D.; COMPAGNONE, N.A. Biosynthesis and action of neurosteroids. **Brain Research Reviews**, 37: 3-12, 2001.

MELLON SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. **Pharmacology & Therapeutics**, 116(1):107-24, 2007.

MENDEZ P, AZCOITIA I, GARCIA-SEGURA LM. Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. **Journal of Endocrinology**, 185(1):11-7, 2005.

MORALES, A.J.; NOLAN, J.J.; NELSON, J.C.; YEN, S.S. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 78:1360-1367, 1994.

MORRISON JH & HOF PR. Life and death of neurons in the aging brain. **Science**. 278:412-419, 1997.

MUKASA, K.; KANESIRO, M.; AOKI, K.; OKAMURA, J.; SAITO, T.; SATOH, S.; SEKIRA, H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) ameliorates the insulin sensitivity in older rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 67:355-358, 1998.

MURGA C, LAGUINGE L, WETZKER R, CUADRADO A, GUTKIND JS. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. **J Biol Chem**, 273(30):19080-5, 1998.

NEPHEW KP, SHEELER CQ, DUDLEY MD, GORDON S, NAYFIELD SG, KHAN SA. Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 143:133-42, 1998.

NICHOLS NR, ZIEBA M, BYE N. Do glucocorticoids contribute to brain aging? **Brain research. Brain research reviews**, 37(1-3):273-86, 2001.

NUÑEZ J, YANG Z, JIANG Y, GRANDYS T, MARK I, LEVISON SW. 17beta-Estradiol protects the neonatal brain from hypoxia-ischemia. **Experimental Neurology**, 208(2):269-76, 2007.

OKABE T, HAJI M, TAKAYANAGI R, ADACHI M, IMASAKI K, KURIMOTO F, WATANABE T, NAWATA H. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 80(10):2993-6, 1995.

ORENTREICH,N.; BRIND, J.L.; VOGELMAN, J.H.; ANDRES, R.; BALDWIN, H. Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 75:1002-1004, 1992.

PACKER, L.; ROSEN, P.; TRITSCHLER, H.J.; KING, G.L. & AZZI, A. Antioxidants in diabetes management. **Ed. Marcel Dekker, New York**, 2000.

PAREKH VV, FALCONE JC, WILLS-FRANK LA, JOSHUA IG, DHOLAKIA JN, PASSMORE JC. Protein kinase B, P34cdc2 kinase, and p21 ras GTP-binding in kidneys of aging rats. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, 229(8):850-6, 2004.

PAUL, S.M & PURDY, R.H. Neuroactive steroids. **The FASEB Journal**, 6: 2311-2322, 1992.

PERRINI, S.; NATALICCHIO, A.; LAVIOLA, L.; BELSANTI, G.; MONTRONE, C.; CIGNARELLI, A. MINIELLI, V.; GRANO, M.; DE PERGOLA, G.; GIORGINO, R.; GIORGINO F. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. **Diabetes**, 53:41-52, 2004.

PLASSART-SCHIESS & E.; BAULIEU, E.E. Neurosteroids: recent findings. **Brain Research Reviews**, 37: 133-140, 2001.

PRINGLE AK, SCHMIDT W, DEANS JK, WULFERT E, REYMANN KG, SUNDSTROM LE. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. **European Journal of Neuroscience**, 18(1):117-24, 2003.

RAPP, P.R & GALLAGHER, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proc. Natl Acad. Sci USA**, 93:9926-9930, 1996.

RAVAGLIA G, FORTI P, MAIOLI F, BOSCHI F, BERNARDI M, PRATELLI L, PIZZOFERRATO A, GASBARRINI G. The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 81(3):1173-8,1996.

ROBERTS E, BOLOGA L, FLOOD JF, SMITH GE. Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. **Brain Research**, 406(1-2):357-62, 1987.

RIBEIRO MF & GARCIA-SEGURA LM. Dehydroepiandrosterone Regulates Insulin-like Growth Factor-1 System in Adult Rat Hypothalamus. **Endocrine**, 17 (2): 129-134, 2002.

RUPPRECHT, R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. **Psychoneuroendocrinology**. 28: 139-168, 2003.

SAFIULINA D, PEET N, SEPPET E, ZHARKOVSKY A, KAASIK A. Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations. **Toxicological Sciences**, 93(2):348-56, 2006.

SALE, E.M & SALE, G.J. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Publicação online, 2007.

SCHIMITT, T.L. HOTZ-WAGENBLATT, A.; KLEIN, H.; DRÖGE, W. Interdependent regulation of insulin receptor kinase activity by ADP and hydrogen peroxide. **J.Biol.Chem**. 280: 3795-3801, 2005.

SCHUMACHER, M. ; AKWA Y.; GUENNOUN, R.; ROBERT, F.; LABOMBARDA, F.; DÉSARNAUD, F.; ROBEL, P.; DE NICOLA, A.F.; BAULIEU, E.E. Steroids synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. **Journal of Neurocytology**, 29: 307-326, 2000.

SCHUMACHER M, GUENNOUN R, MERCIER G, DÉSARNAUD F, LACOR P, BÉNAVIDES J, FERZAZ B, ROBERT F, BAULIEU EE. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. **Brain Research Reviews**, 37: 343-359, 2001.

SCHUMACHER, M.; WEILL-ENGERER, S.; LIERE, P.; ROBERT, F.; FRANKLIN, R.J.M.; GARCIA-SEGURA, L.M.; LAMBERT, J.J.; MAYO, W.; MELCANGI, R.C.; PARDUCZ, A.; SUTER, U.; CARELLI, C.; BAULIEU, E.E.; AKWA, Y. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of nervous system. **Progress in Neurobiology**, 71: 3-29, 2003.

SERRANO F & KLANN E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. **Ageing Res Rev**, 3(4):431-43, 2004.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, 388(4):507-25, 1997.

SIMONCINI, T.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; BRAZIL, D.P.; LEY; CHIN, W.W.; LIAO J. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, 407:538-541, 2000.

SIMONCINI, T.; MANNELLA, P.; FORNARI, L. VARONE, G.; CARUSO, A.; GENAZZANI, A.R. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. **Endocrinology**, 144:3449-3455, 2003.

SIMONCINI, T. & GENAZZANI, A R. Non-genomic actions of sex steroids hormones. **European Journal of Endocrinology**, 148: 281-292, 2003.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESSATTO, C.; DE ANDRADE, A.; SANTOS, M.; HAGEN, M.; BELLO-KLEIN, A.; NETTO, C. A. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23:663-671, 2005a.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESSATTO, C.; TORRES, I.L.S.; DALMAZ, C.; NETTO, C. A. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. **Life Sciences**, 78:271-278, 2005b.

SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 9(1):59-71, 2005.

SONG, G.Y.; KANG, J.S.; LEE, S.Y.; MYUNG, C. Region-specific reduction of G $\beta_4$  expression and induction of the phosphorylation of PKB/Akt and ERK1/2 by aging in rat brain. **Pharmacological Research**, *online*, 2007.

SONNTAG WE, LYNCH CD, CEFALU WT, INGRAM RL, BENNETT SA, THORNTON PL, KHAN AS. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: inferences from moderate caloric-restricted animals. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 54(12): 521-538, 1999.

SONNTAG WE, RAMSEY M, CARTER CS. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. **Ageing Research Reviews**, 2:195-212, 2005.

SOUSA A. & TICKU MK. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, 282(2):827-33, 1997.

SQUIRE, L.R. & KANDEL, E.R. Memory from Mind to molecules. **Scientific American Library, New york**, 1999.

STOFFEL-WAGNER B. Neurosteroid metabolism in the human. **European Journal of Endocrinology**, 145: 669-679, 2001.

STOFFEL-WAGNER, B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. **Annals of the New York Academy Sciences**, 1007: 64-78, 2003.

STROMSTEDT M. & WATERMAN M.R. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. **Brain Res. Mol Brain Res**, 34:75-88, 1995.

SUAREZ C,GARCIA TORNADU I, KHALIL W, BECU-VILLALOBOS D. Dehydroepiandrosterone treatment attenuates oestrogen-induced pituitary hyperplasia. **Journal of Endocrinology**, 174:447-454, 2002.

TAKASE, M.; UKENA, K.; YAMAZAKI, T.; KOMINAMI, S.; TSUTSUI, K. Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. **Endocrinology**, 140:1936-1944, 1999.

TAKEUCHI K, UESHIMA K, OHUCHI T, OKABE S. Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. **Digestive Diseases Sciences**, 39(3):626-34,1994.

TAN K & BAXTER, RC. Serum insulin-like growth factor level in adult diabetic patients. The effect of age. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 63:651-655, 1986.

TORAN-ALLERAND CD, GUAN X, MACLUSKY NJ, HORVATH TL, DIANO S, SINGH M, CONNOLLY ES JR, NETHRAPALLI IS, TINNIKOV AA. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. **Journal of Neuroscience**, 22(19):8391-401, 2002.

TORRES-ALEMAN I. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. **Horm Metab Res**, 31:114-9, 1999.

TSUTSUI, K. & YAMAZAKI, T. Avian neurosteroids. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. **Brain Research**, 678:1-9, 1995.

VAJDA FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, 9(1):4-8, 2002.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39:44-84, 2007.

VALLÉE M, GEORGE O, VITIELLO S, LE MOAL M, MAYO W. New insights into the role of neuroactive steroids in cognitive aging. **Experimental Gerontology**, 39:1695-1704, 2004.

VAN DAM PS, VAN ASBECK BS, ERKELENS DW, MARX JJ, GISPEN WH, BRAVENBOER B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. **Diabetes Metab**, 11(3):181-92, 1995.

VAN GOLEN, C.M. & FELDMAN, E.L. Insulin-like growth factor-1 is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. **Journal Cell Physiology**, 182:24-32, 2000.

VEIGA S, GARCIA-SEGURA LM, AZCOITIA I. Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. **Journal of Neurobiology**, 56: 398-406, 2003.

VILLAREAL, D.T. & HOLLOSZY, J.O. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, 292:2243-2248, 2004.

WANG R, ZHANG QG, HAN D, XU J, LÜ Q, ZHANG GY. Inhibition of MLK3-MKK4/7-JNK1/2 pathway by Akt1 in exogenous estrogen-induced neuroprotection against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats. **Journal of Neurochemistry**, 99(6):1543-54, 2006.

WATANABE H, SAITO H, RYCHAHOU PG, UCHIDA T, EVERS BM. Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation. **Gastroenterology**, 128(5):1391-404, 2005.

WEILL-ENGERER S, DAVID JP, SAZDOVITCH V, LIERE P, EYCHENNE B, PIANOS A, SCHUMACHER M, DELACOURTE A, BAULIEU EE, AKWA Y. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 87(11):5138-43, 2002.

WEINERT BT & TIMIRAS OS. Invited review: Theories of aging. **Journal of Applied Physiology**, 95:1706-1716, 2003.

WERTHER GA, ABATE M, HOGG A, CHEESMAN H, OLDFIELD B, HARDS D, HUDSON P, POWER B, FREED K, HERINGTON AC. Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. **Molecular Endocrinology**, 5:773-778, 1990.

WICKELGREN, I. For the cortex, neuron loss may be less than thought. **Science**, 273:48-50, 1996.

WIDSTROM RL & DILLON JS. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? **Seminars in Reproductive Medicine**, 22:289-298, 2004.

WILLIAMS, M.R.I.; LING, S.; DAWOOD, T.; HASHIMURA, K.; DAÍ, A .; LI, H.; LIU, J.P. FUNDER, J.W.; SUDHIR, K.; KOMESAROFF, P.A .Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of Ars and Ers. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 87:176-181, 2002.

WILLIAMS B, GRANHOLM AC, SAMBAMURTI K. Age-dependent loss of NGF signaling in the rat basal forebrain is due to disrupted MAPK activation. **Neuroscience Letters**, 413(2):110-114, 2007.

WUARIN L, GUERTIN DM, ISHII DN. Early reduction in insulin-like growth factor gene expression in diabetic nerve. **Experimental Neurology**, 130(1):106-14, 1994.

WYMAN MP, ZVELEBIL M, LAFFARGUE M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? **Trends in Pharmacological Sciences**, 24(7):366-76, 2003.

XILOURI M & PAPAFAFIRI P. Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons. **European Journal of Neuroscience**, 23(1):43-54, 2006.

XILOURI, M.; AVLONITIS, N.; CALOGEROPOULOU, T.; PAPAFAFIRI, P. Neuroprotective effects os steroid analogues on P19-N neurons. **Neurochemistry International**, 50: 660-670, 2007.

YAGHMAIE F, SAEED O, GARAN SA, VOELKER MA, GOUW AM, FREITAG W, STERNBERG H, TIMIRAS PS. Age-dependent loss of insulin-like growth factor-1 receptor immunoreactive cells in the supraoptic hypothalamus is reduced in calorically restricted mice. **International Journal of Developmental**, 24(7):431-6, 2006.

YOON SO, YUN CH, CHUNG AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123(12):1597-1604, 2002.

ZHANG L, RUBINOW DR, XAING G, LI BS, CHANG YH, MARIC D, BARKER JL, MA W. Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. **Neuroreport**, 12(9):1919-23, 2001.

ZHANG L, LI BS, MA W, BARKER JL, CHANG YH, ZHAO W, RUBINOW DR. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. **Molecular Brain Research**, 98:58-66, 2002.

ZHENG, W.H.; KAR, S.; DORÉ, S.; QUIRION, R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the akt kinase pathway. **J.Neural Transm. Suppl**, 60, 261-272, 2000.

ZHENG WH, KAR S, QUIRION R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. **Molecular Pharmacology**, 62(2):225-33, 2002.

ZWAIN, I.H. & YEN, S.S.C. Dehydroepiandrosterona : biosynthesis and metabolism in the brain. **Endocrinology**, 140 (2) : 880-887, 1999a.

ZWAIN, I.H. & YEN, S.S.C. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. **Endocrinology**, 140 (8):3843-3852, 1999b.